

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik – Großhadern,
Ludwig - Maximilians - Universität München,
Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Untersuchung und Charakterisierung unterschiedlicher
Tenozyten und vergleichende Prüfung der Biofunktionalität und
Biomechanik eines Polyester- und eines Kollagenzellträgers**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

vorgelegt von

Markus Wagenhäuser
aus Würzburg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Priv. Doz. Dr. Reinhlod A. Lang

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Matthias Pietschmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2012

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sehnenverletzungen	1
1.2 Aufbau und Struktur von Sehnen und der extrazellulären Matrix	2
1.2.1 Morphologie und Metabolismus von Tenozyten	2
1.2.2 Zusammensetzung und Aufbau der extrazellulären Matrix	2
1.3 klinisch relevante Sehnenrupturen	6
1.4 Die Rotatorenmanschette	6
1.4.1 Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette	6
1.4.2 Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen	7
1.4.3 Klassifikation der Rotatorenmanschettenrupturen	8
1.4.4 Spontanheilungsprozess von Sehnengewebe	9
1.4.4 Behandlung von Rotatorenmanschettenrupturen	10
1.4.5 irreparable Rotatorenmanschettenrupturen	11
1.5 Tendon Tissue Engineering	12
1.5.1 Zellträgermaterialien im TTE	12
1.5.2 Zellarten im TTE	14
1.5.3 Strategien zur Qualitätssteigerung zellbesiedelter <i>in vitro</i> Konstrukte	17
1.6 <i>in situ</i> Regeneration	19
1.7 Fragestellung	19
1.7.1 Donorgewebe	19
1.7.2 Zellisolationstechnik und Differenzierungsverhalten	20
1.7.3 Zellträgermaterialien	20
2 Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Patienten	22

2.1.2. Vliese	23
2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.5. Fertigkombinationen von Biochemikalien	28
2.1.6. Medien	28
2.1.7. Zellkulturen	29
2.1.8. Primer	29
2.1.9. Computerprogramme	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Zellkultur	31
2.2.2 Molekularbiologie.....	35
2.2.3. Zellzahlbestimmung auf den Vliesen	39
2.2.4. biomechanische Prüfung der Fadenausreißkraft.....	41
2.2.5. Histologie	42
2.2.6 Statistik	43
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Zellausbeute.....	45
3.2 Zellmorphologie der primären Zellkulturen.....	46
3.3 Zytotoxizitätsanalyse des Enzyms Kollagenase I.....	49
3.4 Molekularbiologie.....	50
3.4.1 Expressionsverhalten wichtiger Strukturproteine.....	50
3.4.2 quantitative mRNA Analyse von Kollagen Typ I und Decorin	52
3.5 Bestimmung der Zellproliferation auf Vliesen.....	54
3.6 Histologien zellbesiedelter Vliese.....	55
3.7 maximale Fadenausreißkraft durch U-Naht Befestigung.....	57
4 Diskussion.....	59
4.1 Diskussion der Methoden	59

4.1.1 Zellisolation.....	59
4.1.2 Zytotoxizitätsprüfung des Enzyms Kollagenase Typ I	60
4.1.3 Zellzahlbestimmung und Zellproliferationsanalyse auf Vliesen.....	61
4.2 Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1 höhere Zellausbeute aus degenerativem Sehnengewebe	62
4.2.2 Unterschiede in der Expression von Kollagen Typ I und Decorin in primären Tenozytenkulturen	63
4.2.3 Expressionsmuster und Dedifferenzierungspotential primärer Tenozytenkulturen	66
4.2.4 Initiale Zelladhärenz und -proliferation auf zellbesiedelten Vliesen.....	69
4.3.4 Untersuchungen der Fadenausreißkräfte.....	71
5. Zusammenfassung	73
6. Fazit und Ausblick	75
7. Abkürzungen	76
8. Literaturverzeichnis	79
9. Abbildungsverzeichnis	93
10. Lebenslauf	94
11. Danksagung	96

1. Einleitung

1.1 Sehnenverletzungen

Häufig gesehene Verletzungen in der orthopädisch-unfallchirurgischen Praxis sind Sehnen- und Bandverletzungen. Verletzungen der Kreuzbänder im Knie und der Rotatorenmanschette an der Schulter spielen eine große Rolle im Versorgungsalltag.

Die Diagnostik konnte sich durch den Einsatz von CT- und MRT- Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten erheblich weiterentwickeln. Unverändert blieben hingegen die therapeutischen Ansätze. Der Goldstandard in der Versorgung von Rupturen des vorderen Kreuzbandes ist die autologe Sehnentransplantation der Patellar- bzw. Graziis-/Semitendinosussehne. In der operativen Versorgung von Rupturen der Rotatorenmanschette ist häufig eine primäre Naht indiziert. Ist diese aufgrund eines zu großen Defektes nicht möglich, ist oft nur noch ein Debridement der Wundränder sinnvoll. Bei jüngeren Patienten kann in diesen Fällen versucht werden, durch Muskel-Sehnen Transfers die Funktion der Schulter zu erhalten und Folgeschäden abzuschwächen. Diese Verfahren sind jedoch aufwendig und der Rehabilitationsprozess schwierig und langwierig.

Primär nicht operable Rotatorenmanschettendefekte sind problematisch, da der Humeruskopf progredient kranialisiert und so im Endstadium die Supraspinatussehne unter dem Akromion vollständig zerstören kann. Durch die so veränderte Biomechanik des Schultergelenkes kann es zu einem schnelleren Voranschreiten von irreparablen Verschleißerscheinungen kommen. Diesen Zustand bezeichnet man als „Defektarthropathie“.

Die stetig steigende Lebenserwartung stellt gesteigerte Ansprüche an Funktion und Leistungsfähigkeit des Körpers. Die Entwicklung von neuen und effizienteren Behandlungskonzepten, die zu funktionell besseren Ergebnissen führen, erscheint daher wichtiger als je zuvor.

Das „tissue engineering“ von Binde- und Stützgewebe ist ein junges Gebiet der Medizin. Es versucht, die Problematik von primär irreparabler Knochen-, Knorpel- und Sehndefekten zu lösen. Dabei soll *in vitro* erstelltes und belastungsfähiges Gewebe die Aufgaben des beschädigten Gewebes nach Implantation übernehmen. Trotz intensiver Bemühungen und eines rasanten Fortschrittes in den letzten Jahren ist ein routinemäßiger Einsatz heute noch nicht möglich. Insbesondere die Herstellung von artifiziellem und funktionsfähigem Sehngewebe steht noch am Anfang.

1.2 Aufbau und Struktur von Sehnen und der extrazellulären Matrix

Sehnen sind anatomische Strukturen, die primär für die Kraftübertragung von Muskeln auf Knochen verantwortlich sind und somit Bewegungen ermöglichen (1). Ihr Aufbau ist komplex und sorgt für eine hohe Reißfestigkeit gegenüber longitudinal angreifenden Kräften.

Tenozyten sind zelluläre Bestandteile in Sehnengewebe und werden von einer extrazellulären Matrix (EZM) umgeben.

1.2.1 Morphologie und Metabolismus von Tenozyten

Tenozyten sind anteilmäßig die größte Zellpopulation in Sehnen (2). Tenozyten zeigen in Sehnen Neugeborener ein morphologisch uneinheitliches Zellbild. Adulte Tenozyten sind jedoch elongierte und spindelförmige Zellen (3), die zwischen den einzelnen Kollagenfasern liegen. Sie haben einen Durchmesser von 8-300 µm und besitzen lange und dünne Zellfortsätze, die für die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen notwendig sind (2). Auch der Zellkern zeigt eine elongierte Form und erstreckt sich annähernd über die komplette Zelllänge (3).

Sowohl das reichlich vorhandene raue endoplasmatische Retikulum als auch der gut entwickelte Golgi Apparat weisen auf Syntheseaktivität hin. Die jedoch nur vereinzelt gelegenen Mitochondrien sprechen für einen geringeren intermediären Stoffwechsel (3, 4). Tenozyten können Energie sowohl aerob als auch anaerob generieren. Allerdings dominiert mit zunehmendem Alter die anaerobe Energiegewinnung und die Syntheseaktivität der Tenozyten verringert sich (5).

Tenozyten sind für die Synthese der Bestandteile der EZM sowie für deren Abbau verantwortlich. Im Folgenden soll der hierarchische Aufbau der EZM beschrieben werden.

1.2.2 Zusammensetzung und Aufbau der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Sehnengewebes besteht aus der Grundsubstanz, elastischen und kollagenen Fasern sowie aus einem geringen Anteil anorganischer Bestandteile (2). In den folgenden Absätzen soll der Aufbau der EZM von Sehnengewebe nun genauer erläutert werden.

1.2.2.1 Kollagene

Kollagenfasern bestehen aus Polypeptidketten (α -Ketten), wobei jede dritte Aminosäure Glycin ist. Außerdem sind sie durch posttranslatorische Veränderungen reich an Hydroxyprolin (6, 7). Drei solcher α -Polypeptidketten formen eine rechtsgängige helicale Tertiärstruktur (8). Anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer primären

Polypeptidketten kann man Kollagene in verschiedene Typen unterteilen. Auch werden fibrilläre Kollagene, die das Grundgerüst eines Gewebes bilden von „fibril-associated collagens with interrupted tripple helices“ unterschieden (9, 10), welche für die Vernetzung der fibrillären Kollagene mit anderen Bestandteilen der EZM verantwortlich sind (9, 11). In Sehngewebe ist Kollagen Typ I mit 70-80% des Trockengewichtes (12) der dominierende Bestandteil und in einer hierarchischen Struktur (s. Abb. 1) organisiert (13, 14). Das Peptid ist ca. 300 nm lang, setzt sich aus 2 α 1-Ketten und einer α 2-Kette zusammen und wird durch Abspaltung von randständigen Peptiden aus einem Vorläufermolekül gebildet (15). Das Enzym Lysyl-Oxidase sorgt durch eine terminale Modifikationen der Telopeptide für die Interaktionen zwischen den Kollagenmolekülen, so dass diese anschließend axial mit einer Peptidlänge von ca. 234 Aminosäuren zu Fibrillen organisiert werden (16). Diese Fibrillen stellen die grundlegende Organisationseinheit des Sehngewebes dar und weisen ein charakteristisches Diffraktionsmuster mit einer D-Periode von 67 nm auf (17).

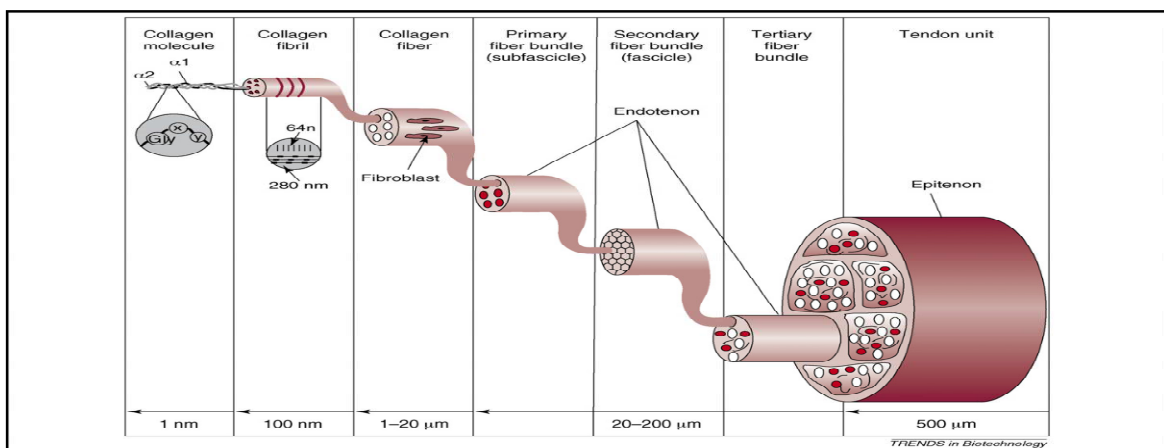


Abbildung 1: Silver, F. H. et al. (14): **hierarchischer Aufbau der Kollagenfaserstruktur einer Sehne.** Die Organisation in Fibrillen, Faszikel und Fasern wird durch lockeres Bindegewebe (Epi- bzw. Endotenon) vorgenommen. Tenozyten sind für die Synthese des Kollagens verantwortlich

Weiterhin ist auch Kollagen Typ III in Sehngewebe vorhanden. Durch den geringeren Fibrillendurchmesser, verglichen zu Kollagen Typ I, sorgt das sich homogen aus drei α 1 Polypeptidketten zusammensetzende Kollagen Typ III, weniger für Stabilität, sondern für eine hohe Gewebeelastizität (18, 19). Darüberhinaus wird der Fibrillendurchmesser von Kollagen Typ I im Sehngewebe durch die Interaktion mit Kollagen Typ III geregelt (20). Degenerativ veränderte Sehnen zeigen dabei eine höhere Expression an Kollagen Typ III, da dieses Strukturprotein auch in rupturierten Sehnen hochreguliert wird (21). Kollagen Typ V, Typ VI, Typ XII und Typ XIV kommen in Sehngewebe nur in geringem Anteil vor (22).

Neben diesen verschiedenen kollagenen Fasergeweben sind auch weitere Proteine in der EZM vorhanden, die verschiedene Regulationsaufgaben erfüllen und mit Kollagenfibrillen und Tenozyten interagieren.

1.2.2.2 Glykoproteine und Proteoglykane

Decorin ist ein Proteoglykan und Bestandteil der EZM in Sehngewebe, aber auch in Knorpel und Knochen zu finden (23). Das bogenförmige Kernprotein besteht aus 10 repetitiven leucinreichen Aminosäuresequenzen in der Hauptdomäne und besitzt zwei Bindungsstellen für fibrilläre Kollagene, die je von ca. 40 Aminosäuren gebildet werden (24, 25). Durch diese Bindungsstellen am Decorin werden Form und Durchmesser der einzelnen Kollagenfibrillen sowie deren Anordnung untereinander reguliert (26, 27). Durch die Bindung von negativ geladenen Glucosaminoglykanseitenketten am Decorinmolekül, die sowohl parallel als auch orthogonal zu den Kollagenfibrillen angeordnet sind, wird die Stabilität der interfibrillären Region hergestellt, welche etwa 16 pN beträgt (28). Weitere Vertreter der Familie der leucinreichen Proteoglykane wie Lumican, Biglycan und Fibromodulin haben eine ähnliche Funktion für die fibrilläre Kollagenorganisation wie Decorin (29).

Die Tenascine sind Glykoproteine, welche die Interaktion von Zellen mit der EZM beeinflussen sowie Zellproliferation und Zellmorphologie regulieren. Fibronectin, ebenfalls ein Glykoprotein, ist auch funktionell in Zelladhäsion und Zellmigration involviert. Werden die Syndecan-4 Bindungsstellen von Fibronectin durch Tenascin-C besetzt, welches in Sehngewebe exprimiert wird, kommt es zu einer Proliferationshemmung der Tenozyten (30). Die Interaktion des Transmembranproteins Syndecan-4 mit Fibronectin ist für die Organisation und Ausbildung des Zytoskeletts wichtig, welches in Tenozyten die typische elongierte Zellform bedingt (31).

Desweiteren regulieren Tenascine intrazelluläre Signalwege, die ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Zellmorphologie haben. So vermindert Tenascin-C die Aktivität von RhoA und erhöht die Expression des Adapterproteins tau 14-3-3, zwei entscheidende Proteine für die Organisation des Zytoskeletts (32, 33). Das Zytoskelett einer Zelle ist dynamischen Auf- und Abbauprozessen unterworfen und trägt maßgeblich zur Ausbildung der Zellmorphologie bei. Die Interaktion zwischen Tenascin-C, Fibronectin und Syndecan 4 sowie die Regulation intrazellulärer Signalwege, werden in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



Abbildung 2 modifiziert nach Chiquet-Ehrismann, R. et al. (34): **Funktion von Syndecan und Tenascin C.** Syndecan-4 interagiert mit Fibronektin und beteiligt sich an der Organisation des intrazellulären Zytoskelts. Tenascin-C blockiert diese Interaktion und die elongierte Zellform geht verloren. Auch durch intrazelluläre Regulationsmechanismen (Rho A und tau 14-3-3) beeinflusst Tenascin-C die Zellmorphologie.

Neben dem Kollagenfasergerüst, den bereits aufgezählten Proteinen der EZM und anorganischen Bestandteilen existieren weitere Proteine, die dominant in Sehnengewebe exprimiert werden. Sie sind diagnostisch und prognostisch von großer Bedeutung, da durch ihr Vorhandensein in Zellkulturen spezifisch ein tenogenes Expressionsmuster nachwiesen werden kann.

1.2.2.3 spezifische Expression in Sehnengewebe

Ein solches in Sehnengewebe spezifisch exprimiertes Protein ist Scleraxis. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor mit einem typischen Helix-Schleife-Helix Motiv. Die spezifische Expression von Scleraxis in Vorläuferzellen von Sehnengewebe zeigt, dass Scleraxis eine Differenzierung von Mesodermzellen in Band- und Sehnengewebe bewirkt. Scleraxis wird aber auch in adulten Tenozyten exprimiert, so dass dieser Transkriptionsfaktor heute als ein wichtiger tenogener Differenzierungsmarker bewertet wird (35-37). Neben Scleraxis stellt auch Tenomodulin einen wichtigen Differenzierungsmarker von Band- und Sehnengewebe dar.

Tenomodulin ist ein Typ II Transmembranprotein und wird in Bindegewebe exprimiert (38, 39). Es ist für die Proliferation von Tenozyten von Bedeutung und für die Ausbildung einer intakten Kollagenfibrillenstruktur notwendig (40). Ein positiver Einfluss der Scleraxisexpression auf die Tenomodulinexpression konnte durch ihr ebenfalls frühes Auftreten während der Entwicklung von Sehnengewebe abgeleitet werden (41).

Die Wachstumsfaktoren „Fibroblast Growth Factor 4 und 8“ (FGF4 und FGF8) können durch eine Interaktion im „mitogen-activated protein“ (MAP) Kinase Pfad die Steigerung der Expression von Scleraxis und Tenomodulin bewirken (42, 43).

Der streng hierarchisch organisierte Aufbau des Sehnengewebes verleiht ihm eine hohe Stabilität und Reißfestigkeit. Bei supramaximaler Beanspruchung kann jedoch auch

Sehnengewebe rupturieren. Nachfolgend soll auf relevante orthopädisch klinische Sehnenrupturen eingegangen werden und insbesondere die Pathogenese, Klassifikation und Therapiemöglichkeiten von Rupturen der Rotatorenmanschette beschrieben werden.

1.3 klinisch relevante Sehnenrupturen

Clayton R. A et al. konnten in ihren epidemiologischen Untersuchungen die häufigsten klinischen Sehnen- und Bandrupturen identifizieren. Achillessehnenrupturen sind mit einer Inzidenz von 11,33% die häufigsten Sehnenrupturen, gefolgt von Rupturen des vorderen Kreuzbandes mit einer Inzidenz von 8,06%. Wesentlich seltener treten Rupturen der Patellarsehne und der langen Bizepssehne auf. Hier beträgt die Inzidenz 0,68% (Patellarsehne) und 0,53% für die lange Bizepssehne. Ein ebenfalls klinisch relevantes Problem sind Rotatorenmanschettenrupturen (RMR) mit einer Inzidenz von 3,73%, die sowohl Männer als auch Frauen (m:w ca. 1:1) in höherem Lebensalter (durchschnittliches Erkrankungsalter: m: 47,5 Jahren; w: 57,2 Jahren) betreffen, und deren Behandlung schwierig ist (44).

Die RMRen können ätiologisch in akute traumatische Rupturen und chronisch degenerative Rupturen eingeteilt werden. Die Mehrzahl der Rupturen (ca. 95%) ist chronisch degenerativ bedingt und betrifft vor allem ältere Patienten. Die Prävalenz im Kollektiv der Patienten über 60 Jahre beträgt ca. 30%. Jüngere Patienten erleiden fast ausschließlich akut traumatische Rupturen der Rotatorenmanschette mit einer Prävalenz von ca. 5-8% (45).

Da die Therapie irreparabler Sehnenrupturen der Rotatorenmanschette mittels „tissue engineering“ bzw. „tissue regeneration“ durch autologe Zellen und Scaffoldmaterialien das Thema dieser Arbeit ist, soll auf Diagnostik und Therapiemöglichkeiten der RMR genauer eingegangen werden.

1.4 Die Rotatorenmanschette

1.4.1 Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette

Die Rotatorenmanschette besteht aus dem M.supraspinatus, dem M.infraspinatus, dem M.teres minor und dem M.subscapularis. Diese Muskeln haben alle ihren Ursprung an der Scapula und umgeben das Schultergelenk haubenförmig. Der M.supraspinatus, der M.infraspinatus und der M.teres minor inserieren am Tuberculum major und der M. subscapularis am Tub. minor des Humeruskopfes. M.infraspinatus und dem M.teres minor sorgen für die Außenrotation, der M. subscapularis für die Innenrotation und der M. supraspiantus für die Abduktion im Schultergelenk. Eine weitere Aufgabe aller Muskeln

der Rotatorenmanschette besteht in der Zentrierung, Stabilisierung und Kompression des Humeruskopfes in die konkav geformte Cavitas glenoidalis (46). Funktionell muss auch die lange Bizepssehne zur Rotatorenmanschette gerechnet werden, da ihr ebenfalls ein stabilisierende und zentrierende Wirkung auf den Humeruskopf in der Gelenkpfanne zugeschrieben wird (47).



Abbildung 3 A und B: Aufbau und Muskeln der Rotatorenmanschette (M.suprascapularis/a, M.infrascapularis/b, M.teres minor/c, M.subscapularis/d) umhüllen das Schultergelenk. Sie ermöglichen Bewegung und sorgen für Stabilität. A: Ansicht von dorsal B: Ansicht von lateral (Sobotta Anatomieatlas, 20. Auflage 1993, Urban u. Fischer)

1.4.2 Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen

Schulter- und Nackenschmerzen besitzen eine Prävalenz von 15,4% mit einer deutlichen Geschlechts- (Frauen>Männer) und Altersabhängigkeit (alt>jung) (48). Die Häufigkeit von RMR und des Impingementsyndroms steigt mit zunehmenden Lebensalter an und kann zu einer signifikanten Bewegungseinschränkung im Schultergelenk sowie zu starken Schmerzzuständen führen.

Die Gesamtprävalenz asymptomatischer RMRen liegt bei ca. 23% mit einem deutlichen Anstieg im Kollektiv der über 80-jährigen auf ca. 51% (49). Primär asymptomatische Sehnenrisse der Rotatorenmanschette neigen mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 51% dazu, in ein symptomatisches Stadium überzugehen, was mit erheblichen funktionellen Beeinträchtigungen im Alltag einhergehen kann (50, 51).

Bis heute ist die genaue Pathophysiologie der Entstehung einer RMR nicht vollständig geklärt. Es existieren verschiedene Konzepte, die unterschiedliche auslösende Ursachen annehmen. Allgemein anerkannt ist, dass degenerative Veränderungen zur RMR führen, während traumatische Ereignisse für die Pathogenese im höheren Lebensalter von untergeordneter Bedeutung sind und nur bei jungen Menschen Bedeutung besitzen (52, 53).

Ein wichtiger Faktor für die Entstehungspathogenese von RMRen ist das Höhertreten des Humeruskopfes und die damit verbundene mechanische Kompression der Sehnen der Rotatorenmanschette im subacrominalen Raum, zwischen Humeruskopf und Acromion.

Rupturierte Sehnen zeigen charakteristische histologische Veränderungen, wie Kalzifizierungen, zellulär chondrale Dedifferenzierungen, muköse Degenerationen und lipomatöse Einlagerungen (54, 55). Auch auf zellulärer Ebene wurden strukturellen Veränderungen als pathogenetisch wichtige Merkmale der Sehnendegeneration nachgewiesen. Durch Modifikation der normalen Konfiguration des Kollagengerüsts sowie durch die Infiltration von Fibroblasten und vaskulären Gewebes in das Sehnengewebe wird die Entstehung eines Risses begünstigt (56).

Das Wissen um diese pathologischen Veränderungen und die Beobachtung von typischen Lokalisationen von Rissen sowie von typischen Rissformen der Rotatorenmanschette führte zur Entstehung verschiedener Klassifikationssysteme. Einige der wichtigsten und häufig angewandten Klassifikationen sollen folgend kurz beschrieben werden.

1.4.3 Klassifikation der Rotatorenmanschettenrupturen

1934 beschrieb *Codman* die Entwicklung einer Partialruptur an der artikulären Fläche der Supraspinatussehne im Bereich des Humeruskopfes (57).

Neer teilte die RMR 1983 in drei Stadien ein: Durch rezidivierende exzessive (Über-) Beanspruchungen des Schultergelenks kommt es zu Ödembildungen und vereinzelt Blutungen im Bursa- und Sehnengewebe (Stadium I), die zu Fibrosierungen von Schleimbeutel und an der Sehne führen (Stadium II). Diese Veränderungen bedingen schließlich partielle bzw. transmurale Rupturen der Rotatorenmanschette (Stadium III). Das sukzessive Auftreten dieser Veränderungen konnte charakteristischen Altersklassen zugeordnet werden (58).

1990 führte *Patte* ein Klassifikationssystem ein, das neben der Ausdehnung des Risses auch seine Lokalisation in der sagittalen und frontalen Ebene mit berücksichtigt. Auch die Integrität des langen Kopfes der Bizepssehne sowie der trophische Zustand der Muskulatur sind weitere Parameter dieser Klassifikation (59).

Thomazeau erarbeitete 1997 eine radiologische Einteilung, die sich am trophischen Zustand der Muskulatur orientiert. Dieser wird anhand magnetresonanztomographischer Bilder beurteilt und in 3 Schweregrade eingeteilt (60). Insbesondere der trophische Zustand der Muskulatur ist ein wichtiger Parameter für die Prognose der RMR (61).

Millstein und *Snyder* unterteilten 2003 die RMR in 4 Grade, die sie nach ihrer Lage und Ausdehnung klassifizierten. Dem ersten Grad entsprechen oberflächliche Läsionen, die zu einer Irritation synovialer Strukturen führen und eine Ausdehnung von weniger als 1 cm aufweisen. RMR, die eine Ausdehnung von mehr als 3 cm aufweisen und sich über mehrere Sehnen erstrecken können, wurden als Maximalvariante dem vierten Grad

zugeordnet. Außerdem wird in dieser Klassifikation zwischen gelenkseitig gelegenen Rupturen (A=artikular), schleimbeutelseitig gelegenen Rupturen (B=bursal) und transmuralen Rupturen (C=complete) unterschieden (62).

Im deutschsprachigen Raum wird im klinischen Alltag häufig die Einteilung nach Habermayer verwendet. Habermayer ordnete die Rupturen nach ihrer Lokalisation und definierte 3 spezifische Zonen

Zone A: ventrale Abschnitte mit Subscapularissehne, Rotatorenintervall und langer Bizepssehne

Zone B: kranialer Abschnitt im Bereich der Supraspinatussehne

Zone C: dorsale Läsionen im Bereich der Mm. infraspinatus und teres minor
Die Verlängerungslinie der Spina scapulae trennt Zone B von Zone C
(63)

Jedoch können bis heute weder die verschiedenen histologisch deskriptiven Klassifikationssysteme (58, 59, 62), noch die Einbeziehung klinischer Parameter wie Alter (53, 64), Dauer der Symptomatik (65, 66), Geschlecht (67, 68), Bewegungsausmaß (66, 69) und Grad der Muskelkraft (66, 69, 70), auch aufgrund teils widersprüchlicher Datenlage, eine eindeutige Entscheidungsgrundlage für das therapeutische Vorgehen liefern (71).

1.4.4 Spontanheilungsprozess von Sehnengewebe

Der spontane Heilungsprozess von Sehnengewebe ist langwierig und führt für Patienten selten zu klinisch zufriedenstellenden Ergebnissen. Das Ausmaß der Regenerationsfähigkeit ist limitiert. Ein Grund dafür ist die schlechte Blutgefäßversorgung (72). Der spontane Heilungsprozess kann in drei Hauptphasen unterteilt werden. Diese müssen nicht streng aufeinander folgen, sondern können teilweise überlappend ablaufen (73).

In der ersten Woche nach Defektentstehung kann das Einwandern von Entzündungszellen in das verletzte Areal beobachtet werden. In dieser inflammatorischen Phase wird vor allem nekrotisches Gewebe resorbiert.

Dieser Phase schließt sich eine Phase gesteigerter Kollagensynthese an, in der der Körper versucht den Defekt zu decken.

Nach ca. sieben Tagen beginnt die dritte und letzte Phase des Heilungsprozesses. Diese Phase bezeichnet man als Rekonstruierungsphase. Diese Phase ist von individuell

unterschiedlicher Dauer und endet mit der Bildung eines funktionell weniger belastbaren Narbengewebes (73) (74).

Durch strukturelle Modifikationen des Aufbaues der EZM entspricht das so entstandene Narbengewebe in seiner funktionellen mechanischen Belastbarkeit nicht nativem Sehngewebe. Allerdings kann gerade dieser Selbstheilungsprozess bei großen transmuralen RMren nicht beobachtet werden. Dies ist auch ein Grund, weshalb die Therapie bis heute schwierig und für Patienten aufwändig und langwierig ist. Im folgenden Abschnitt sollen Grundzüge therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten kurz aufgezeigt werden.

1.4.4 Behandlung von Rotatorenmanschettenrupturen

RMren werden heute, wann immer möglich, einer operativen Versorgung zugeführt. Falls eine operative Therapie nicht möglich sein sollte, kommt in Ausnahmefällen auch eine primär medikamentös/physiotherapeutisch konservative Therapie in Betracht.

Die medikamentöse Therapie sollte vorzugsweise mit den nichtsteroidalen antiinflammatorischen Substanzen Naproxen (75) oder Diclofenac durchgeführt werden, da sich diese Präparate gegenüber anderen antiinflammatorischen Medikamenten überlegen zeigten (76). Physiotherapeutische Therapiemaßnahmen zielen auf die Kräftigung der noch nicht geschädigten Muskulatur sowie auf die Wiederherstellung bzw. Optimierung der Zentrierung des Humeruskopfes im Gelenk und der Dehnung der Schultermuskulatur ab. Im Rahmen einer konservativen therapeutischen Anwendung sollte jedoch auch die Hüft- und Rumpfmuskulatur mit eingeschlossen werden (77). Begleitend werden physikalische Therapieverfahren zur Behandlung der entzündlichen Prozesse im Subacromialraum angewandt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der lokalen Infiltrationstherapie mit Kortison, die einen unmittelbaren entzündungshemmenden Effekt hat. Es konnte in vergleichenden Studien gezeigt werden, dass die klinischen Ergebnisse einer systemischen Applikation von Kortikosteroiden durch Injektion in die Glutealregion einer lokalen Therapie durch Injektion in die Subacromialregion vergleichbar sind (78).

Durch die konservativen Therapiemaßnahmen kann eine Verbesserung des Bewegungsumfanges und eine Reduktion des subjektiven Schmerzempfindens erreicht werden. Daraus ergibt sich folglich eine höhere Belastungsfähigkeit des Schultergelenkes (79). Trotzdem ist in vielen Fällen eine primär operative Therapie anzustreben, um die volle Funktionsfähigkeit des Schultergelenkes dauerhaft wiederherzustellen.

In der operativen Versorgung hat sich in den letzten Jahren zunehmend ein Übergang von offenen Methoden hin zu arthroskopischen Verfahren vollzogen. Ältere Untersuchungen

sahen im Gesamtergebnis einen Vorteil der offenen Operationsmethode (80). Wird jedoch als Beurteilungskriterium der University of California at Los Angeles Score (UCLA-Score) verwendet, scheinen beide Operationsverfahren klinisch gleichwertige Ergebnisse über einen Beobachtungszeitraum von einem bzw. acht Jahren zu liefern (81, 82). Die kürzere postoperative Erholungsphase und eine schnellere Wiedereingliederung in den normalen Alltag sprechen jedoch in vielen Fällen für die Anwendung der minimal invasiven Vorgehensweise (83).

Allerdings sind 2 Jahre nach operativer Therapie, insbesondere bei transmuralen Rupturen, in Bezug auf Muskelkraft und Bewegungsumfang immer noch Defizite gegenüber der gesunden, nicht operativ versorgten Seite festzustellen (84). Nur 27% bis 74% aller Patienten, die sich einer offenen Rotatorenmanschettenoperation unterzogen, gaben ein zufriedenstellendes oder exzellentes postoperatives Resultat nach einem Beobachtungszeitraum von 13 Jahren an (68). Desweiteren konnte durch magnetresonanztomographische Nachuntersuchungen gezeigt werden, dass bis zu 57,6% aller Patienten mit einer transmuralen Ruptur eine erneute Ruptur der Rotatorenmanschette nach operativer Therapie erleiden (85).

1.4.5 irreparable Rotatorenmanschettenrupturen

Primär nicht reparable RMRen stellen, aufgrund der teilweise subjektiv unbefriedigenden postoperativen Ergebnisse, ein großes Problem dar. Passende und geringe Donormorbidität verursachende autologe Sehnentransplantate, wie sie bei Rupturen des vorderen Kreuzbandes existieren, gibt es bislang in der Versorgung von RMRen nicht.

Der Einsatz von allogenen Sehnentransplantaten ist in solchen Fällen nur selten ein adäquater Lösungsansatz und ist keine klinische Routine (86). Aufgrund des erhöhten Infektionsrisikos und einer möglichen Abstoßungsreaktion empfahl Moore 2006 die klinische Anwendung nicht (87).

Muskel-Sehnentransferoperationen des M.lattissimus dorsi (88), des M.pectoralis major (89), des M.deltoideus (90) und des M.teres major (91) sind aufwendige operative Versorgungsoptionen und ihr Einsatz ist bis heute limitiert. So ist der postoperative Rehabilitationsbedarf enorm und die funktionellen Ergebnisse sind nicht immer zufriedenstellend (92).

Der endoprothetische Gelenkersatz mit einer inversen Schulterprothese ist häufig die einzige definitive Versorgungsmöglichkeit dieser Rupturen. Die Indikationsstellung erfolgt insbesondere wenn der pathologische Endzustand einer Defekarthropathie eingetreten ist. Trotz Verlustes der Muskelkraft des M.supraspinatus wird durch Medialisierung und Kaudalisierung die Biomechanik des M.deltoideus verbessert und somit eine weitgehende

Bewegungsfähigkeit des Schultergelenkes erhalten. Durch die teilweise auftretende Lockerung der Prothese kann es im Behandlungsverlauf zu diversen Problemen kommen (93, 94).

Einen möglichen Lösungsansatz bietet daher das „tendon tissue engineering“ (TTE). Es könnte zukünftig in der Versorgung von primär irreparablen RMR eine alternative Therapiemöglichkeit liefern.

1.5 Tendon Tissue Engineering

Das TTE verfolgt das Ziel, ersatzfähiges Sehnenmaterial bereits *in vitro* zu konstruieren und es dann anschließend in Sehnendefekte *in vivo* zu implantieren, wo es sofort als ein funktionsfähiges Ersatzgewebe *in situ* zur Verfügung steht. Zu diesem Zweck werden unterschiedliche Zellträgermaterialien mit verschiedenen vitalen Zellenarten besiedelt und mit verschiedenen Methoden zur funktionellen Qualitätssteigerung behandelt. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Zellträger aus unterschiedlichen Materialien verwendet, die sowohl Vor- als auch Nachteile in der Verwendung für das TTE besitzen.

1.5.1 Zellträgermaterialien im TTE

Legt man die mechanische Funktion von Sehnengewebe zugrunde, sollte der optimale Zellträger eine große mechanische Festigkeit, insbesondere gegenüber Zugbelastungen, besitzen. Eine hohe Biokompatibilität und Biofunktionalität müssen gefordert werden sowie eine regelbare Degradation des Materials nach Implantation, um die problemlose Hybridisierung mit vitalem Zellmaterial zu ermöglichen. Eine leichte intraoperative Handhabung sowie eine gute Formanpassung der zellbesiedelten Konstrukte sind praktische Ansprüche an den idealen Zellträger (95).

1.5.1.1 Polyester

Ein häufig verwendetes Material sind abbaubare Biopolymere aus Glykolsäure (PGA), Milchsäure (PLA), L-Milchsäure (PLLA) oder eine Kombination aus beiden Polymeren (PLGA).

PGA Zellträger weisen eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Belastungen auf (96), zeigten jedoch im Vergleich zu PLGA- und PLLA-Zellträgern einen durch schnellere Degradation bedingten frühzeitigen Integritätsverlust. Diese schnelle Degradation führt zur Bildung von sauren Degradationsprodukten, die möglicherweise zu einer lokalen oder systemischen inflammatorischen Reaktion führen können (100). Ein weiterer limitierender Faktor für den Gebrauch von Polyestern im Rahmen des TTE ist ihre Hydrophobität, die zu einer geringen initialen Zellanhaftung führt (99). Nach

Besiedelung von PLLA- und PLGA-Polymeren zeigten die Zellen eine tenozytenähnliche Morphologie und verglichen mit PLGA und PGA Polymeren konnte die höchste Proliferationsrate auf PLLA Polymeren erreicht werden (97, 98).

Der Verbundwerkstoff Ethisorb (Ethicon, Norderstedt) konnte bereits zeigen, dass er bei Verwendung in einem Kaninchenmodell keine erhöhte inflammatorische Reaktion hervorruft (101). Ein möglicher Grund liegt eventuell in der längeren Resorptionszeit des PDS Anteils, so dass geringere Mengen toxischen Potenzials pro Zeiteinheit freigesetzt werden. Die durchschnittlichen Resorptionszeiten der im Rahmen des „tissue engineering“ verwendeten Biopolymeren zeigt Tabelle 1.

1.5.1.2 Kollagenderivate

Kollagen Typ 1 ist das dominierende Strukturprotein in Sehngewebe, so dass Kollagenderivate häufig als Zellträger für das TTE verwendet werden. Als Grundlage für solche Kollagenmatrices dienen sowohl rekombinant erzeugtes Kollagen als auch Kollagene tierischen Ursprungs. Bei letztgenannten besteht jedoch die Gefahr einer allergischen Abstoßungsreaktion und der xenogenen Krankheitsübertragung (102).

Für Kollagengele konnte eine gute Besiedlungsfähigkeit gezeigt werden, jedoch müssen sie aufgrund mangelnder mechanischer Festigkeit durch weitere Materialien ergänzt werden (103). Durch die Kombination von Kollagengelen mit Kollagenvliesen konnte eine erhöhte mechanische Festigkeit bei weiterhin guter Biofunktionalität erreicht werden (104, 105). So zeigten zellbesiedelte Kollagenvliese, die in einen Patellarsehnendefekt implantiert wurden, annähernd dreiviertel der mechanischen Belastbarkeit von nativem Patellarsehngewebe (106). Als Weiterentwicklung könnte eine stabile basale Kollagenmembran, in der die Kollagenfasern dicht gepackt liegen, in offenporige Kollagenvliese für die Aufnahme von Zellen integriert werden und so einen hohen Beanspruchbarkeit gegenüber Zugbelastungen bei guter Besiedelbarkeit garantieren.

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten bei der Verarbeitung besiedelter Kollagenderivate, der möglichen Immunreaktion und der begrenzten mechanischen Festigkeit, verglichen mit anderen synthetischen Zellträgermaterialien, ist der klinische Einsatz jedoch weiterhin problematisch (107, 108). Die Resorptionszeit von Kollagenen nach Implantation liegt dabei zwischen denen von PGA und PDS.

Tabelle 1: Resorptionszeiten von Materialien im „tissue engineering“ (Herstellerangaben)

	Kollagen	PGA	PDS
Resorptionsdauer in Tagen	60-140	90	210

1.5.2.3 Zuckerpolymere

Die Zuckerpolymere Chitin, Chitosan, Alginat oder Agarose fanden trotz ihrer hydrophilen Eigenschaften kaum Verwendung als Zellträgermaterialien für die Regeneration von Sehnenersatzgewebe, wurden aber häufiger als Scaffoldmaterialien für Knorpel- oder Knochenersatzgewebe eingesetzt (109, 110). Durch ihre guten Zelladhäsionseigenschaften und die nachgewiesene hohe Zellproliferationsrate nach Besiedelung weisen sie eine befriedigende Biofunktionalität auf (109). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Zuckerpolymeren, ist die Möglichkeit, während der technischen Fertigung die Porosität der Strukturen bis hin zu Mikrokanälen entsprechend den Erfordernissen des Zielgewebes einzustellen und so eine gute Verteilung der Zellen im Zellträger zu garantieren (111).

Durch die Kombination des positiv geladenen Chitosan und der negativ geladenen Hyaluronsäure, einem repetitiv linear aufgebauten Glykosaminoglykan, können die biomechanischen Eigenschaften des Konstruktes verbessert und die Produktion des wichtigen Strukturproteins Kollagen Typ 1 *in vivo* angeregt werden (112, 113).

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit besteht durch die Verbindung von Chitosan mit anionischem Alginat, wodurch die unbefriedigende Zellanhaftung verbessert werden konnte (114).

Eine weitere wichtige Frage im TTE ist die Wahl geeigneter Zellen für die Besiedelung der Zellträger *in vitro*. In der Vergangenheit wurden bereits Erfahrungen mit verschiedenen Zellarten gesammelt. Nachfolgend soll auf die am häufigsten verwendeten Zellarten eingegangen werden und mögliche Schwierigkeiten ihrer Verwendung erläutert werden.

1.5.2 Zellarten im TTE

Zellen, die für die Besiedelung der Zellträger im Bereich des TTE zur Anwendung kommen, sollten idealerweise aus autologem Gewebe gewonnen werden, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Eine ausreichende Anzahl von vitalen Zellen nach Isolation, eine hohe Expansionsfähigkeit in *in vitro* Kulturen sowie ein stabiles tenogenes Expressionsmuster während der Kultivierung sind wichtige Voraussetzungen, um optimale Ausgangsbedingungen für die *in vitro* Konstruktion von Sehnengewebe zu schaffen (115).

1.5.2.1 Tenozyten

Tenozyten stellen die größte Zellfraktion im Sehnengewebe dar (2, 12) und durch ihre Fähigkeit zur Produktion von tenogener EZM eignen sie sich ideal zur Besiedelung auf Zellträgern im TTE. Die Isolation von Tenozyten aus Sehnengewebe kann mittels enzymatischer Gewebeverdauung (EGV) (96) oder durch Zellauswanderung (ZAW) (116, 117) erreicht werden.

Mit Tenozyten besiedelte PGA Zellträger, lieferten zur Überbrückung eines Sehnendefekts sowohl in einem Maus- als auch einem Huhnmodell überzeugende histologische und biomechanische Ergebnisse (96, 118). Es konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass Tenozyten nach Implantation *in vivo* überlebensfähig sind und das Potential zur Produktion einer tenogenen EZM besitzen.

Allerdings ist die *in vitro* Kultivierung von Tenozyten diffizil, da es mit zunehmender Zellpassage zu einer Veränderung der Zellmorphologie und der Genexpression der Tenozyten kommt. Die Zellproliferationsrate ist hierbei jedoch konstant. Die Zunahme von abgerundeten, morphologisch dedifferenziert erscheinender Zellen bei gleichzeitiger Verminderung von elongierten tenogenen Zellen sowie eine erhöhte Kollagen Typ III Expression bei gleichbleibender Gesamtkollagenexpression in Verbindung mit einer verminderten Expression des Proteoglykans Decorin, konnten in höheren Zellpassage beobachtet werden (119). Eine Verbesserung des tenogenen Expressionsmusters in *in vitro* Kulturen konnte in Untersuchungen humaner Tenozyten in einer high-density Kultur durch einen leichten Anstieg der Expression des Transkriptionsfaktors Scleraxis, sowie eine konstante Kollagen Typ I Expression nachgewiesen werden (116).

In Tierversuchen konnte durch die intratendinöse Injektion des Enzyms Kollagenase, dem selben Enzym, das auch in dieser Arbeit während der EGV zur Zellisolation verwendet wurde, das Auftreten eines chondrogenen Phänotyps und von Ossifikationen beobachtet werden (120).

Da autologe Tenozyten für das TTE aus nativem Gewebe gewonnen werden, muss nach einem geeigneten Spendergewebe gesucht werden, dessen Verlust zu geringen Funktionsbeeinträchtigungen beim Spender führt. Der Verlust der Sehne des M. semitendinosus und der langen Bizepssehne haben, verglichen mit anderen Sehnenstrukturen, einen deutlich geringeres Funktionsdefizit zur Folge, das jedoch individuell unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Die Sehnen des M. semitendinosus und der langen Bizepssehne stellen somit eine mögliche Zellquelle für die Gewinnung humaner autologer Tenozyten dar.

1.5.2.2. mesenchymale Stammzellen

Es gibt adulte und embryonale Stammzellen, die ein unterschiedliches Potenzial zur Differenzierung und Gewebekonstruktion besitzen. Im Rahmen des TTE werden adulte mesenchymale Stammzellen verwendet, da sie leicht zugänglich sind und ihr Differenzierungspotenzial in Stütz- und Speichergewebe nachgewiesen werden konnten (121).

Die Möglichkeit der Differenzierung bei erhaltener Vitalität von rundlichen mesenchymalen Stammzellen in elongierte tenozytenähnliche Zellen *in vivo* konnte durch Fluoreszenzuntersuchungen nachgewiesen werden (122).

Auch konnten stammzellbesiedelte Konstrukte wie Kollagengele und PLGA Zellträger eine histologisch belegbare Verbesserung der Gewebeneubildung in Sehnendefekten zeigen, die sich in einer erhöhten Produktion von Kollagen Typ I und Typ III belegen ließ. Zusätzlich fand sich eine Verbesserung der biomechanischen Festigkeit dieser Regenerate verglichen mit Regeneraten, die initial mit nicht zellbesiedelten Konstrukten überbrückt worden waren (123, 124).

Obwohl mesenchymale Stammzellen relativ einfach aus Knochenmark gewonnen werden können, benötigt man für ihre invasive Gewinnung zumeist ein anästhesiologisches Verfahren. Neuere Untersuchungen fanden, dass auch in Fettgewebe Zellen mit multipotentem Potential vorhanden sind, die Knochenmarkstammzellen in ihrem Differenzierungsvermögen ähneln (125). Ihre Gewinnung ist wesentlich einfacher und mit weniger Risiken verbunden.

Ein weiteres Problem stellt die geringe Zellausbeute an MSC's nach Isolation aus dem Knochenmark dar, sowie deren sinkende Anzahl im Knochenmark und ihre verminderte Differenzierungsfähigkeit mit zunehmendem Alter (126). Es sind aber gerade ältere Menschen, die im Mittelpunkt der Bemühungen für eine Therapie mit *in vitro* erzeugtem Sehnenersatzgewebe stehen. Auch hier stellen neue Quellen der Stammzellgewinnung, wie Fettgewebe oder Nabelschnurblut, mögliche Alternativen dar.

1.5.2.3 dermale Fibroblasten

Dermale Fibroblasten wurden als Zellen zur Konstruktion von Sehnengewebe *in vitro* oder *in vivo* bisher nur selten eingesetzt. Jedoch konnten sowohl in *in vitro* Experimenten, in denen sie statischen Zugbelastungen ausgesetzt waren, als auch in *in vivo* Defektmodellen mit Zellträgerüberbrückung, den Tenozyten vergleichbare histologische und biomechanische Ergebnisse erzielt werden (127, 128). Somit stellen auch dermale Fibroblasten einen möglicherweise geeigneten Zelltyp für das TTE dar.

In tierexperimentellen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe scheint die Datenlage darauf hinzuweisen, dass autologe Tenozyten gegenüber nativen (=unbehandelten) Knochenmarkszellen aber auch gegenüber *in vitro* kultivierten mesenchymalen Stammzellen ein höheres Potenzial zur Erzeugung von neuem Sehnengewebe besitzen. Dies betraf sowohl die biomechanischen als auch die histologischen Eigenschaften des gebildeten Sehnenregeneratgewebes (Daten noch nicht veröffentlicht).

Die Gewinnung von Tenozyten ist ohne größere Spendermorbidity möglich und eine Differenzierung in Kultur, wie bei mesenchymalen Stammzellen, nicht notwendig. Im

Vergleich zu Fibroblasten ist unsere Arbeitsgruppe der Auffassung, dass die Möglichkeit der Synthese funktionell weniger belastbarer EZM, wie beispielsweise bei der Entstehung von Narbengewebe, bei der Verwendung von Tenozyten geringer ist als bei anderen Zellarten. Aus diesen Gründen wurde entschieden, im Rahmen dieser Arbeit humane Tenozyten zu verwenden.

Nach Besiedlung der Zellträger mit vitalen Zellen existieren einige schon beschriebene Methoden, um die Qualität zellbesiedelter Konstrukte vor möglicher Implantation zu erhöhen. Einige erfolgsversprechende Methoden werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

1.5.3 Strategien zur Qualitätssteigerung zellbesiedelter *in vitro* Konstrukte

Um die Qualität des *in vitro* erzeugten Sehnenersatzgewebes zu verbessern, werden verschiedene Verfahren angewandt. Oberflächenveränderungen der Zellträger sollen eine verbesserte Zelladhärenz erzielen, durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren soll die Zellproliferation gesteigert werden und die Applikation von Zugspannung ermöglicht die Nachahmung von *in vivo* Belastungen des Sehnen Gewebes.

1.5.3.1 Oberflächenveränderungen der Zellträger

Oberflächenveränderungen von Zellträger, die den einleitenden und wichtigen Schritt der Adhäsion von Zellen an den Zellträgern unterstützen sind von besonderer Bedeutung, da eine schnelle und gute Zelladhärenz der erste und wichtigste Schritt für eine effiziente Besiedlung darstellt. Hierzu wurden bereits verschiedene Ansätze untersucht, die im Folgenden kurz umrissen werden sollen.

Integrine sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne mit kurzen RGD-Aminosäuresequenzen (Arg-Gly-Asp) interagiert und somit für die initiale Zellanhaftung entscheidende Funktion besitzt. Durch die Beschichtung von Seidenzellträgern mit diesen kurzen Aminosäuresequenzen konnte die Zellanhaftung um 250% und die Produktion des Strukturproteins Kollagen I um 410% gesteigert werden (129). Fibronectin besitzt ebenfalls RGD Aminosäuresequenzen und seine Verwendung zur Modifikation von artifiziellen Oberflächen konnte ebenfalls eine Verbesserung der Zellanhaftung nachweisen (97, 130).

Ferner konnte durch die Erzeugung von Nanofasern auf Zellträgern, die eine Steigerung der Porosität und des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses bewirken, eine Verbesserung der Zellanhaftung und Zellproliferation sowie eine Steigerung der Matrixproduktion gefunden werden (131, 132).

1.5.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren regeln und stimulieren durch die Interaktion mit zellulären Proteinen eine Vielzahl von zellulären Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Matrixproduktion. Die genauen Abläufe dieser Interaktionen und Regulationsmechanismen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden (95).

Es konnte gezeigt werden, dass die separate Applikation von Wachstumsfaktoren wie bFGF, „Platelet Derived Growth Factor-BB“ (PDGF-BB) und „Insulin-like Growth Factor-1“ (IGF-1) eine Steigerung der Zellproliferation verursacht. Die größte Steigerung jedoch konnte durch eine Kombination von drei Wachstumsfaktoren (b-FGF: 5 ng/ml + IGF-1: 100 ng/ml + PDGF-BB: 50 ng/ml) erzielt werden (133).

Diese Option stellt eine gute Möglichkeit dar, eine schnelle *in vitro* Expansion und Proliferation von primär isolierten Tenozyten, auf bereits besiedelten Zellträgern zu erreichen. Da der Einsatz von Wachstumsfaktoren das Risiko eines ungesteuerten Zellwachstums birgt, bedarf es weiterer *in vivo* Versuche, um die Möglichkeit einer benignen oder malignen Neoplasie auszuschließen.

1.5.3.3 mechanische Stimulation

Sehnen haben die Funktion, die Muskelkräfte auf den Knochen zu übertragen und Bewegungen zu ermöglichen. Dabei sind sie zyklischen Zugkräften ausgesetzt. Diese biologischen Belastungen werden im TTE versucht durch Applikation externer Zugbelastungen auf die zellbesiedelten Konstrukte *in vitro* zu imitieren.

Eine externe mechanische Belastung führte in *in vitro* Untersuchungen bei zweiwöchiger Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in Kollagengelen zu einer signifikant höheren Zellzahl, einer Erhöhung der Kollagenproduktion sowie zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften wie Reißfestigkeit und Elastizitätsmodul (134). Eine tägliche zyklische Belastung mit 4 Hz mit einer maximalen Beanspruchungsspitze von 2 MPa scheint den *in vivo* auftretenden Belastung am ähnlichsten zu sein und erzielte, im Vergleich zu anderen Belastungsmustern, die besten biomechanischen Ergebnisse (135).

Nach Implantation von zuvor *in vitro* mechanisch belasteten zellbesiedelten Konstrukten konnte eine Verbesserung der biomechanischen Regeneratparameter gezeigt werden. Verglichen mit nativen Sehnen konnte nach Defektüberbrückung und vorheriger mechanischer *in vitro* Stimulation 70% (vs 55% nicht mechanisch stimuliert) der maximalen Ausreißkraft und 85% (vs 55% nicht mechanisch stimuliert) der linearen Steifigkeit erreicht werden (106).

Jedoch fanden die hier beschriebenen Methoden bis heute nur in wenigen publizierten Studien Anwendung. Dies liegt unter anderem daran, dass sie zeitaufwendig, bisher nicht

standardisierbar und teuer in der Durchführung sind. Ein routinemäßiger klinischer Einsatz ist daher noch nicht abzusehen.

Einen dem TTE ähnlichen Ansatz, der sich jedoch von der Grundidee vom „tissue engineering“ unterscheidet, stellt die sogenannte *in situ* Regeneration dar.

1.6 *in situ* Regeneration

Das TTE versucht, funktionelles und stabiles Sehngewebe durch verschiedene Methoden *in vitro* zu konstruieren und dieses anschließend zu implantieren. Die *in situ* Regeneration verfolgt demgegenüber das Ziel, nach der Besiedelung von Zellträgern mit vitalen Zellen *in vitro*, eine möglichst schnelle Implantation dieser Konstrukte zu ermöglichen. Somit soll sich stabiles Gewebe durch funktionelle Belastung *in vivo* ausbilden und sich gleichzeitig an die individuellen Belastungen anpassen. Die verwendeten Zellarten und Zellträgermaterialien entsprechen denen des TTE.

1.7 Fragestellung

Es existieren zahlreiche *in vivo* Tiermodelle, bei denen nach *in vitro* Besiedelung von Zellträgern mit Tenozyten ein Sehndefekt überbrückt wurde (96) (118). Einige dieser Untersuchungen beschrieben das Expressionsverhalten und die Morphologie tierischer Tenozyten während der *in vitro* Kultivierung (119). Auch beschäftigten sich mehrere Untersuchungen mit der Biofunktionalität und der Biokompatibilität tierischer Tenozyten mit verschiedenen Zellträgern mit teils überzeugendem Erfolg. Die Übertragbarkeit von Daten aus Experimenten an tierischen Zellen ist jedoch nur bedingt auf die humane Situation zulässig.

1.7.1 Donorgewebe

Aufgrund des beschränkten Zugangs zu geeignetem humanem Gewebematerial verwendeten nur wenige experimentelle Untersuchungen humane Tenozyten. Eine wichtige Fragestellung der *in situ* Regeneration ist die Suche nach geeigneten humanen Donorgeweben.

Eine denkbare Möglichkeit stellt die lange Bizepssehne dar, die im Rahmen der operativen Sanierung von RMR aufgrund sekundärer Schädigung häufig durchtrennt wird. Der hierbei entstehende Kraftverlust ist klinisch vernachlässigbar, so dass nur eine geringe Donormorbidität erzeugt wird.

In der operativen Versorgung von Rupturen des vorderen Kreuzbandes stellt die Sehne des M. semitendinosus ein etabliertes autologes Sehnentransplantat dar, das ebenfalls nur zu einer geringen Donormorbidität führt.

Das vordere Kreuzband ist keine Sehne und kann auch primär nicht zur Isolierung von Tenozyten herangezogen werden, da der Defekt und das klinische Defizit für den Spender zu groß wären. In dieser Arbeit soll das vordere Kreuzband, eine ligamentäre Struktur, als Vergleichsgruppe zu Sehnengewebe dienen und wird im Rahmen von Knieprothesenimplantationen gewonnen.

1.7.2 Zellisolationsmethodik und Differenzierungsverhalten

Neben der Frage eines passenden Donorgewebes existieren zwei verschiedene Möglichkeiten, Zellen aus Sehnengeweben zu isolieren. So besteht die Möglichkeit, Zellen durch enzymatische Gewebeverdauung (EGV) (96) (136) und durch Zellauswanderung (ZAW) (116) aus dem Ausgangsgewebe zu separieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die verschiedenen Isolationsmethoden und die verschiedenen humanen Sehnengewebe, wie die Bizepssehne, das anteriore Kreuzband und die Sehne des M. semitendinosus anhand verschiedener Parameter auf ihre Eignung zur Verwendung in der *in situ* Regeneration zu prüfen. Zudem sollte eine Abschätzung der Zytotoxizität des für die EGV verwendeten Enzyms Kollagenase I erfolgen.

Da für die spätere Besiedelung der Zellträger Tenozyten in ausreichender Menge zur Verfügung stehen müssen, wurde die maximale primäre Zellausbeute aus den verschiedenen Ausgangsgeweben durch die verschiedenen Isolationsmethoden vergleichend untersucht.

Desweiteren sollte geklärt werden, ob sich die isolierten primären Tenozytenkulturen in ihrer Morphologie sowie im Expressionsverhalten wichtiger Gene des Sehnengewebes unterscheiden und ob die Tenozytenkulturen eine stabile tenogene Differenzierung nach mehreren Zellpassagen bewahren können. Um eine Dedifferenzierung in die chondrogene Zellreihe bzw. in die osteogene Zellreihe festzustellen, wurde den Tenozytenkulturen das Expressionsmuster von Knorpel-, Knochen- und Bindegewebszellen gegenübergestellt.

1.7.3 Zellträgermaterialien

Eine weitere wichtige Fragestellung der *in situ* Regeneration ist die Suche nach geeigneten Zellträgermaterialien. Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb auch die Besiedelbarkeit und das Proliferationsverhalten humaner Tenozyten auf einem PGA/Poly-P-Dioxanon (PDS) Zellträger (Ethisorb), der bislang vorwiegend zum Verschluss von

Duralecks verwendet wurde, und einem Kollagenvlies mit einseitig verstärkender Membran aus bovinem Perikard (Shoulder Patch).

Abschließend sollte die biomechanische Ausreißkraft der Zellträger nach 56-stündiger Vorinkubation in Zellkulturmedium nach U-Naht Befestigung bestimmt werden, um Rückschlüsse auf die klinische Anwendbarkeit bei der Rotatorenmanschettenrekonstruktion zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patienten

Bei den Gewebeproben zur Gewinnung humaner Tenozyten handelte es sich um Gewebereste, die bei Operationen in der orthopädischen Klinik Großhadern anfielen. Sie wurden steril entnommen und in Transportmedium bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Es konnten Gewebestücke der langen Bizepssehne bei Primärimplantationen einer Schulterendoprothese (Ø Patientenalter: 67 Jahre) sowie Gewebestücke des anterioren Kreuzbandes bei Neuimplantation einer Knieendoprothese (Ø Patientenalter: 70 Jahre) gewonnen werden. Zudem wurden humane Tenozyten jugendlicher Spender aus Geweberesten der Sehne des M.semitendinosus isoliert, welche zur Rekonstruktion des anterioren Kreuzbandes genutzt wurde (Ø Patientenalter: 17 Jahre). Die Gewinnung aller Zellen erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München; die Daten der Spender wurden anonymisiert. Tabelle 2 bietet eine Übersicht aller Spender. Keinem Patienten wurde dabei zusätzlich Gewebematerial, das über die notwendige Resektion während des Operationsverfahrens hinausging, entnommen.

Tabelle 2: Patientenkollektiv

Patienten ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	Operation
1	79	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
2	60	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
3	70	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
4	67	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
5	62	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
6	76	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen Schulterendoprothetik
7	54	Weiblich	Omarthrose	Primärimplantationen

				Schulterendoprothetik
8	74	Weiblich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
9	79	Weiblich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
10	61	Männlich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
11	68	Weiblich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
12	63	Weiblich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
13	70	Männlich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
14	74	Weiblich	Gonarthrose	Primärimplantationen
				Knieendoprothese
15	16	Weiblich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
16	36	Männlich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
17	12	Weiblich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
18	16	Weiblich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
19	13	Weiblich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
20	14	Männlich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)
21	11	Weiblich	VKB Ruptur	VKB Ersatzplastik (Semitendinosus)

2.1.2. Vliese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Vliese auf Besiedlungseffizienz und Primärstabilität getestet.

Ethisorb Dura Patch ist ein synthetischer und resorbierbarer Vlies aus einem Vicryl (Polyglactin 910) und einem PDS Garn, der einseitig nochmals durch einen gefärbten Poly-P-Dioxanon (PDS) Film benetzt wurde. Polyglactin 910 ist ein Copolymer, dass zu

ca. 90% aus „polyglycolic acid“ (PGA) und zu ca.10% aus „polylactic acid“ (PLA) besteht. Im Folgenden wird dieses Vlies deshalb als PGA/PDS Vlies bezeichnet. Die poröse Struktur erlaubt das Einwachsen von körpereigenem fibrotischem Gewebe, während die einseitige Benetzung durch den gefärbten PDS Film nur in geringem Maße eine Penetration von Cerebralflüssigkeit zulässt und somit für eine optimale Abdichtung sorgt. Sein Flächengewicht beträgt $0,025 \text{ g/cm}^2$. Er wird bereits klinisch zur temporären Deckung von Leckagen der Dura mater encephali bzw. spinalis verwendet. Seine Resorptionszeit nach Implantation beträgt ca. 90 Tage. (Herstellerangaben)

Das Shoulder Patch der Firma TETEC ist ein Kollagenvlies, das durch eine basale Verstärkungsmembran zusätzlich an Stabilität gewinnt. Dies ist insbesondere für die postoperative Stabilität von großer Bedeutung. Das Kollagenvlies besitzt eine Höhe von 3,4-4,0 mm und ein Flächengewicht von $200\text{-}250 \text{ g/m}^2$. Die Porengröße beträgt $110\text{-}150 \mu\text{m}$ (Herstellerangaben).

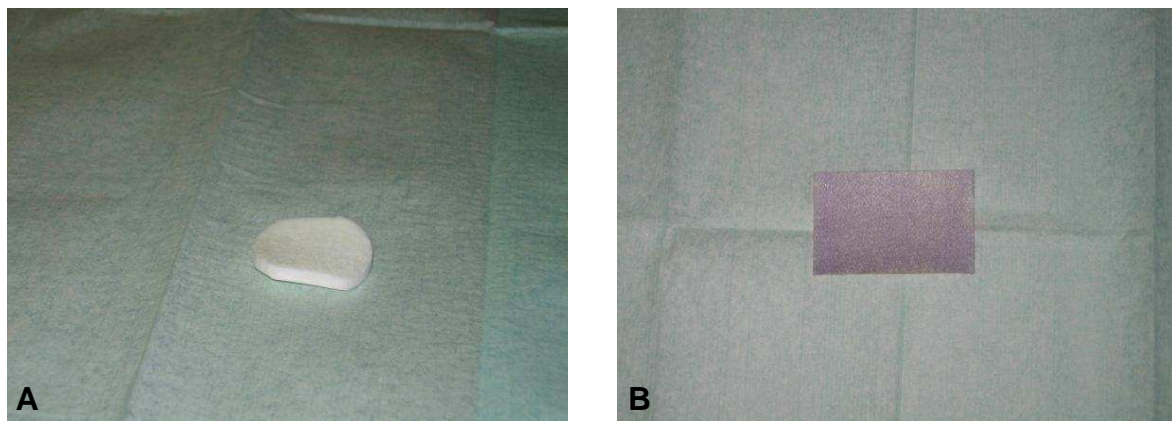


Abbildung 4: Kollagenvlies (Shoulder Patch) und PGA/PDS Vlies (Ethisorb). dargestellt sind Vliese, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Das Kollagenvlies liegt mit der Verstärkungsmembran dem Boden auf. Der Ethisorb Dura Patch liegt mit der gefärbten, und mit einem PDS Film überzogenen Seite, nach oben

A: Kollagenvliese (Shoulder Patch)

B: Polyglactin 910/PDS (PGA/PDS) Vlies (Ethisorb)

2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

DMEM/Ham's F12	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM/Ham's F12	Biochrom, Berlin, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Bacillol AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Cellulose-Acetate-Filter $0,2 \mu\text{m}$	Whatman, Dassel, Deutschland
Cellulose-Acetate Filter $0,22 \mu\text{m}$	Beckton Dickson Labware, Le point de

Einbettförmchen Cryomold	Claix, Frankreich
Größe: 15x15x5 mm	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
25x20x5 mm	
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einwegskalpelle Größe 15	Medizin AG, Köln Deutschland
Elektrophoresekammer,	Whatman, Dassel, Deutschland
Typ Horizon 11.14	
ELISA Analysegerät „microplate reader“	MWG Biotech, München, Deutschland
Erlenmeyer Kolben	Schott Duran, Wertheim, Deutschland
Ethisorb „Durapatch“ 6x4 cm	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Eukitt	O.Kindler, Freiburg, Deutschland
Fadenhalter	Vedena, Braak, Deutschland
flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Gefrierschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gewindeschraube Größe 8	Ettinger, Hofolding, Deutschland
Gigasept R AF	Schülke&Mayr, Norderstedt, Deutschland
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kamerasystem Axio Cam MRc 5	Zeiss, München, Deutschland
Knochenbiopsiestanze Ø8,0 mm	Biomed, München, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nunc, Kamstrupvej, Dänemark
Kryo-Thermogefäss	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Kryotom, Modell CM 3050	Leica, Schalksmühle, Deutschland
Kryotommesser	Jung, Heidelberg, Deutschland
Laborhandschuhe puderfei Größe M	Lohmann & Rauscher, Wien, Österreich
Größe S	
Lichtmikroskop, Modell Axioskop 40	Zeiss, München, Deutschland
Lichtmikroskop, Modell Axiovert 40 CFL	Zeiss, München, Deutschland
light cycler Kapillaren 20 µl	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
light cycler Zentrifugenadapter	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
light cycler, Modell 2.0	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
Lineal 30 cm	Sanford, Hamburg, Deutschland

Nahtfaden Ethibond Exel 2 (22 mm)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht Assistnet, Altnau, Schweiz
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
PCR Analysegerät, Modell Fluor-S™ Multilmager	Biorad, München, Deutschland
PCR Maschine, DNA engine	Biorad, München, Deutschland
PCR Test Röhrchen	G.Kisker, Steinfurt, Deutschland
Photometer, Modell Gen Quant II	Pharmazia Biotech, Cambridge, England
Pipetierhilfe 0,2 µl-2 µl	Gilson, Middleton, USA
1 µl-10 µl	
2 µl-20 µl	
20 µl-100 µl	
50 µl-200 µl	
100 µl-1000 µl	
Pipetierhilfe elektrisch, Typ accu-jetR pro)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10ml, 100 ml, 1000 ml)	Gilson, Middleton, USA
RNase freie Pipettenspitzen	G.Kisker, Steinfurt, Deutschland
RNase freies Wasser	Ambion, Kassel, Deutschland
Schüttler, Modell MTS4	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Serumpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning incorporated, New York, USA
Shoulder Patch (Kollagenvlies)	Tetec, Reutlingen, Deutschland
Spannungsgerät	Whatman, Dassel, Deutschland
Standardgesichtsmasken	Mölnlycke health care, Göteborg, Schweden
sterile Einwegpinzetten	Angiokard Medizintechnik, Freiburg, Deutschland
sterile Handschuhe	Semperit, Wien, Österreich
sterile Petri-Schalen	Nunc, Kamstrupvej, Dänemark
sterile Pinzette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
sterile Schere	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
steriles Abdecktuch	Sengewald, Rohrdorf-Thansau, Deutschland
Sterilwerkbank, Modell Hera safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank	

Teströhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge, Modell 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Wägebapier 9x11,5 cm	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Wärmeplatte	Medax, Rendsburg, Deutschland
Wasserbad	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Brand, Wertheim, Deutschland
96-WellPlatten	Nunc, Kamstrupvej, Dänemark
24-Well Platten	Nunc, Kamstrupvej, Dänemark
Zell Filter 100 µm	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Zellkulturflaschen (80 cm ² , 175 cm ² , 500 cm ²)	Nunc, Kamstrupvej, Dänemark
Zentrifuge, Multifuge, Modell 1L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Beckton Dickson Labware, Le point de Claix, Frankreich
Zwickuniversaltestmaschine, Modell Z010	Zwick/Roell, Ulm, Deutschland

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Amphotericin B Lösung 250µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ascorbinsäure (Pulver)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagenase I alpha 1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA „loading dye“ (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA Leiter 100 bp (0,1 µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Eosin Y-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol (Oberflächendesinfektion)	Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland
Ethanol 70%	Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland
Ethanol 96 %	Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Hämalaun n. Meyer Lösung	Apotheke Universität München

	Innenstadt, München, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin, Deutschland
light cycler FastStart DNA Master _{PLUS}	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
SYBR Green I	
MEM-Aminosäuren (50x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)	Biochrom-Seromed, Berlin, Deutschland
Rnase Inaktivierungsspray	Ambion, Kassel, Deutschland
Sucrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
TAE Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellproliferationsreagenz WST-1	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland

2.1.5. Fertigkombinationen von Biochemikalien

dNTP Set	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
light cycler primer Set	Search LC, Heidelberg, Deutschland
Reverse Transkription System	Promega, Madison, USA
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase mit Puffern	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.6. Medien

Zellkulturmedium für Tenozyten/Chondrozyten:

DMEM/Ham's F12
+ 10% FCS
+ 2 mM L-Glutamin
+ 1250 µg/ml Ascorbinsäure (140 µM)
+ Aminosäuren (L-Arginin HCL: 6,3 mg/ml, L-Cystin: 1,2 mg/ml,
L-Histidin HCL H₂O: 2,1 mg/ml, L-Isoleucin: 2,6 mg/ml, L-Leucin: 2,6 mg/ml, L-
Lysin HCL: 3,65 mg/ml, L-Methionin: 0,75 mg/ml, L-Phenylalanin: 1,6 mg/ml, L-
Threonin: 2,4 mg/ml, L-Tryptophan: 0,5 mg/ml, L-Valin: 2,3 mg/ml, L-Tyrosin: 1,8
mg/ml)

- + 60 U/ml Penicillin/Streptomycin (60 µg/ml)
- + 27 nM Amphotericin B (25 ng/ml)

Zellkulturmedium für Fibroblasten/Osteoblasten:

- DMEM
- + 10% FCS
- + 60 U/ml Penicillin/Streptomycin (60 µg/ml)

Einfriermedium:

- 70% Zellkulturmedium
- 20% FCS
- 10% DMSO

2.1.7. Zellkulturen

primäre humane Tenozyten s. Tabelle 2 S. 22	Isolation im Zellkulturlabor am Klinikum der Universität München (Großhadern)
humane Fibroblasten	Provitro, Berlin, Deutschland
Humane Osteoblasten	Provitro, Berlin, Deutschland
primäre humane Chondrozyten (cDNA im Labor bereits vorhanden)	Isolation im Zellkulturlabor am Klinikum der Universität München (Großhadern)

2.1.8. Primer

Tabelle 3: Sequenzen und Amplifikatlänge der Primer für die RT-PCR

Gen	Primer Sequenz	Amplifikatlänge
1. GAPDH	Sense: GAGTCCACTGGCGTCTCCAC Antisense: GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT	188 bp (137)
2. Kollagen Typ I, alpha 1	Sense: GGCCCAGAAGAACTGGTACA Antisense: GGCTGTTCTTGCACTGGTAG	200 bp (137)
3. Kollagen Typ III, alpha 1	Sense: CCAGGAGCTAACGGTCTCAG Antisense: CAGGGTTTCCATCTCTTCCA	103 bp (137)
4. Decorin	Sense: TGCTGTTGACAATGGCTCTC Antisense: GCCTTTTTGGTGTGTGTCC	192 bp (137)
5. Fibronektin	Sense: ATGATGAGGTGCACGTGTGT Antisense: CTCTTCATGACGCTTGTGGA	135 bp (137)

6. Tenascin-C	Sense: TCAAGGCTGCTACGCCTTAT Antisense: GTTCTGGGCTGCCTCTACTG	230 bp (137)
7. Scleraxis	Sense: CCTGAACATCTGGGAAATTTTAC Antisense: CGCCAAGGCACCTCCTT	111 bp (116)
8. Tenomodulin	Sense: CCATGCTGGATGAGAGAGGT Antisense: CTCGTCTCCTTGGTAGCAG	123 bp (137)
9. Osteopontin	Sense: TTGCTTTTGCCTCCTAGGCA Antisense: GTGAAACTTCGGTTGCTGG	430 bp (138)
10. Aggrecan	Sense: CACTGTTACCGCCACTTCCC Antisense: ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG	183 bp (139)

Tabelle 4: Primer für die relative Quantifizierung durch „real-time“ PCR. Die Primersequenzen sind Eigentum der Firma Search LC und können daher in dieser Arbeit keine Erwähnung finden. Die verwendeten Lot-Nummern sowie die Anzahl an Vergleichskopien in den Lösungen sind aufgeführt.

Gen	Lot-Nummer-Kopien	Firma
Cyclophilin B	120906 ($2,8 \times 10^5$); 090408 ($3,1 \times 10^5$);	Search LC
Kollagen Typ I, alpha 1	290606 (5×10^3); 020608 ($2,1 \times 10^4$)	Search LC
Decorin	140508 ($4,5 \times 10^4$);	Search LC

2.1.9. Computerprogramme

Graph Pad Prism 3.0	Statistische Auswertung
Roche Molecular Biochemicals Light cyclers software version 3.5	real-time PCR
Multianalyst version 1.1	PCR
Softmax Pro 4	Proliferation assay
TestXpert version 12.1	Biomechanische Testung der Vliese in Universalprüfmaschine

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1. allgemeine Bemerkungen

Entsprechend den Standards für das Arbeiten an vitalen humanen Zellen unter sterilen Bedingungen, wurden alle Arbeiten der Zellkultur unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Erwärmung aller verwendeten Medien und Lösungen erfolgte im Wasserbad bei 37°C kurz vor ihrer Verwendung .

Soweit nicht anders erwähnt erfolgte die Inkubation der Zellen in einem Inkubator, der folgende Umgebungsatmosphäre erzeugte:

Temperatur	37°C
CO ₂ Gehalt	5%
Luftfeuchtigkeit	95%

Zur Herstellung von Zellpellets wurde die Zellsuspension in einer Zentrifuge für 5 min bei 1500 rpm und einer Temperatur von 20°C zentrifugiert.

2.2.1.2. Zellisolation humaner Tenozyten

Das Patientenmaterial wurde während der Operationen steril entnommen und in Zentrifugenröhrchen, die mit Transportmedium gefüllte waren, transportiert. Das Transportmedium besaß, im Gegensatz zu normalem Zellkulturmedium, einen 3-fach höheren Anteil an Penicillin/Streptomycin. Es folgte der Transport ins Zellkulturlabor. Hier wurden die Proben maximal 7 h bis zur weiteren Verarbeitung bei -4°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Zellisolation wurden zwei Petri-Schalen mit je 10 ml Zellkulturmedium und zwei Petri-Schalen mit 10 ml sterilem PBS gefüllt.

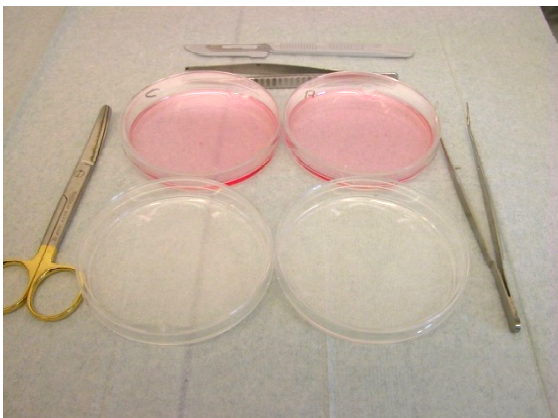


Abbildung 5: benötigte Materialien zur Zellisolation. Die Präparate wurden mit Schere und Skalpell zerkleinert und anschließend in den mit Zellkulturmedium gefüllten Petri-Schalen aufbewahrt.

Anschließend wurde das Gewicht der beiden mit Zellkulturmedium gefüllten Petri-Schalen bestimmt. Die Gewebestücke wurden einmal mit PBS gewaschen und danach in ca. 1 cm große Stücke geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, fremde Gewebsanteile wie Bindegewebe und Blutgefäße, zu entfernen. Durch Bestreichen der Sehnenfaszikel mit der stumpfen Skalpellseite wurden kleinere Oberflächendefekte gesetzt, um den Zellen ein leichteres Auswandern zu ermöglichen sowie einen leichteren enzymatischen Zugang während des Verdauungsprozesses zu schaffen. Durch erneute Bestimmung des Gewichtes der mit Sehnenstücken beladenen Petri-Schalen konnte aus der Differenz der beiden Messwerte das eingesetzte Gewebegewicht quantitativ nach folgender Formel bestimmt werden.

$$\text{Gewebegewicht} = G(g) - G(r) \quad (1)$$

$G(g)$ = Gewicht der Petrischalen mit den Gewebestücken

$G(r)$ = Rohgewicht der Petrischalen mit Zellkulturmedium

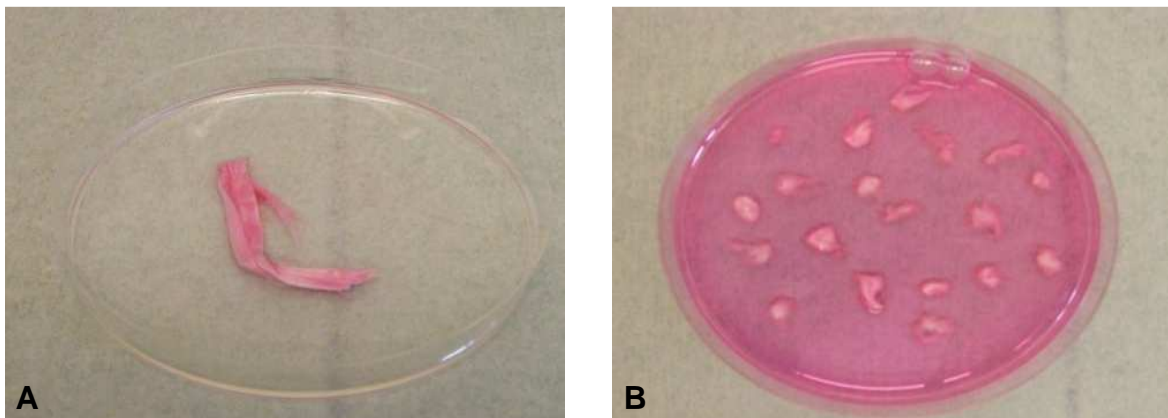


Abbildung 6: Sehne nativ und nach Präparation. dargestellt ist eine Bizepssehne nach Explantation im Operationssaal und Transport ins Labor

A: Sehne in nativem Zustand in mit PBS gefüllter Petri-Schale

B: Sehne nach Präparation in mit Zellkulturmedium gefüllter Petri-Schale

2.2.1.2.1. Zellisolation durch EGV

Für die Isolation humaner Tenozyten durch EGV wurde ein modifiziertes Protokoll nach Cao D et al und Cao Y et al (96, 136) verwendet. Zunächst wurde lyophilisiertes Enzym Kollagenase I (0,2%) in DMEM aufgelöst und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe über eine Cellulose-Acetat Membran (0,22 µm) steril filtriert. Nun wurden die präparierten Sehnenstücke in Kollagenase I (0,2%) im Brutschrank inkubiert, um Sehnenfaszikel zu verdauen und somit Zellen freizusetzen. Sobald die Sehnenstücke sichtbar zersetzt waren (ca.16-20 h) und die Flüssigkeit ein milchiges Aussehen bekam, wurde der Verdau beendet und die Zellsuspension über einen Zellfilter (100 µm) filtriert, um grobe

Gewebestücke zu entfernen. Anschließend wurde die gereinigte Suspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nochmal in PBS gewaschen und schließlich in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. 2.2.1.3, S.33) wurden die Zellen in große Kulturflaschen (175 cm²) ausgesät und in Kultur genommen.

2.2.1.2.2. Zellisolation durch ZAW

Für die Isolation humaner Tenozyten durch ZAW wurde das Protokoll nach Schulze-Tanzil et al (116) verwendet. Die präparierten Sehnenstücke wurden in mit Zellkulturmedium gefüllten Petri-Schalen inkubiert. Dabei wurden initial 4 ml Kulturmedium in die Petri-Schalen gefüllt, um den Sehnenstücken eine bessere Adhärenz am Kulturboden zu ermöglichen. Nach 24 h wurde das Volumen auf 10 ml ergänzt, welches auch bei den anschließenden Medienwechseln im Abstand von 3-4 Tagen jeweils ersetzt wurde. Nach ca. 2-3 Wochen waren erste migrierende Tenozyten um die adhärenen Gewebestücke herum sichtbar. Sobald die auswachsenden Zellverbände eine Konfluenz von ca. 90% erreichten, wurden die Sehnenstücke mit einer sterilen Pinzette vorsichtig aus den Petri-Schalen entfernt und in eine neue mit 4 ml Kulturmedium gefüllte Petri-Schale gelegt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nun wurden die adhärenen Tenozyten passagiert und in kleine Kulturflaschen (80 cm²) ausgesät. Für die weitere Kultivierung in folgenden Zellpassagen wurden große Kulturflaschen (175 cm²) verwendet.

2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl/ml wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Das resuspendierte Zellpellet wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt (je 10 µl). Da dieser Farbstoff die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann, konnten lebende Zellen von toten Zellen durch fehlende Farbstoffaufnahme unter dem Lichtmikroskop unterschieden werden. Zur genauen Zellzahlbestimmung wurden 4 Großquadrate eines Hämozytometers (HZ) ausgezählt. Die Zellzahl/ml wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl (HZ)} / 4 \times V_f \times 10^4 \quad (2)$$

V_f = Verdünnungsfaktor = 2

2.2.1.4. Wechseln des Zellkulturmediums

Zellkulturmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Hierfür wurde das alte Zellkulturmedium abpipettiert und die Zellen einmalig mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurde neues Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.5. Zellkultivierung

Die Zellpassage erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 90%. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit sterilem PBS wurde Trypsin/EDTA (1%) zugegeben. Nach 5-10 min Inkubationszeit im Brutschrank lösten sich die Zellen von der Unterlage und auch die Zell-Zell-Kontakte wurden gelöst, so dass abgerundete und vereinzelt liegende Zellen vorlagen. Dieser Vorgang wurde durch optische Kontrolle mit einem Lichtmikroskop verifiziert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium im Überschuss terminiert. Das im Zellkulturmedium enthaltene FCS besitzt einen hohen Proteinanteil. Diese Proteine können kompetitiv um die Bindungsstelle am katalytischen Zentrum des Trypsins konkurrieren und eine weitere Proteolyse weitgehend verhindern. Schließlich wurde die Suspension zentrifugiert und nach Aufnahme des Zellpellets in Kulturmedium erneut in Kulturflaschen (175 cm²) ausgesät. Die Zellzahl betrug hierbei zwischen 1×10^5 und $1,625 \times 10^6$ Zellen.

2.2.1.6. Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Grundlage für das Einfrieren der Zellkulturen bildete das Zellpellet. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml kaltem Einfriermedium (70% Zellkulturmedium, 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen übertragen. Das DMSO verhindert die Bildung von Kristallen während des Einfriervorgangs. Anschließend wurde die Suspension zügig bei -80°C eingefroren und nach 4 wöchiger Lagerungszeit in Stickstoff (ca. -195°C) zur Langzeitlagerung überführt.

Zur erneuten Kultivierung vorgesehene Zellkulturen wurden aus dem Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sobald sich der Eiszyylinder vom Kryoröhrchen lösen ließ, wurde dieser in 10 ml frischem Zellkulturmedium verdünnt. Die Verdünnung sollte den zytotoxischen Effekt des DMSO abmildern. Durch anschließende Zentrifugation bildete sich ein Zellpellet. Dieses wurde nochmals in PBS gewaschen und schließlich in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen konnten nun erneut in „tripple“ Zellkulturflaschen (500 cm²) mit einer Anzahl von bis zu 1×10^6 /Kulturflasche ausgesät werden.

2.2.1.7. Zytotoxizitätsbestimmung der Kollagenase I

Für dieses Experiment wurden humane Fibroblasten verwendet. Die Zellen befanden sich bei Beginn des Experimentes in der vierten Zellpassage. Je 1×10^5 Zellen wurden in einem Volumen von 20 µl suspendiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen, die mit 1 ml 0,2%iger Kollagenase I gefüllt waren, pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank. Die Auswertung erfolgte nach 0,5 h und nach 2 h.

Zunächst wurden die Zentrifugenröhrchen zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das gebildete Zellpellet wurde einmalig in PBS gewaschen und danach in 100 µl frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl/ml erfolgte nach der Trypan Blau Methode (s. 2.2.1.3, S. 33). Zu jedem Auswertungszeitpunkt wurden 6 Proben ausgezählt.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1. RNA Isolation

Als Grundlage zur Isolation der Gesamt-RNA diente das Zellpellet humaner Tenozyten der 3. Zellpassage. Die Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl Lysispuffer aufgelöst und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die Gesamt-RNA für die Genexpressionsanalyse wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Fi. Quiagen) laut Herstelleranleitung isoliert. Zur Homogenisierung des Lysats wurden grobe Partikel mittels eines „Shredders“ (Fi. Quiagen) abgetrennt. Durch Zugabe von Ethanol (70%) wurde die RNA gefällt und anschließend an eine „Mini Spin Säule“ gebunden. Dem mehrmaligem Waschen der RNA mit den Puffern „RPE“ und „RW1“ folgte ein Verdau noch vorhandener DNA durch DNase I für 10 min. Anschließend wurde die Gesamt-RNA getrocknet und danach mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt. Zunächst wurde die Gesamt-RNA im Verhältnis 1:25 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Konzentration wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der Gesamt-RNA konnte durch die Bildung des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} abgeschätzt werden, wobei der Quotient den Wert 1,6 nicht unterschreiten sollte.

2.2.2.2. cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung mit dem „Reverse Transcription System“ (Fi. Promega, Mannheim) unter Einsatz 1 µg Gesamt-RNA. Vor der reversen Transkription wurde die RNA für 10 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe des „Mastermixes“ erfolgte die cDNA Synthese in einem „Thermocycler“ (Fi Biorad, München). Der „Mastermix“ setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

RNA	1 µg (Volumen 10,4 µl ≈ x µl RNA plus x µl Wasser)
MgCl ₂	4 µl

RT-Puffer 10x	2 µl
dNTPs	2 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
„primer“	0,5 µl
reverse Transkriptase	0,6 µl

Für die Transkription wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Dauer	Temperatur
Bindung der Primer an die RNA	10 min	25°C
Transkription (Synthese der cDNA)	60 min	42°C
Denaturierung der reversen Transkriptase	5 min	95°C

Die erstellten cDNA Transkripte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.3. RT-PCR und real-time PCR

2.2.2.3.1. RT-PCR

Grundlage für die Durchführung der RT-PCR zur Genexpressionsanalyse waren die cDNA Transkripte. Folgende Reagenzien wurden für eine RT-PCR Ansatz mit einem Endvolumen von 20 µl verwendet.

cDNA	1 µl (2 µl Tenomodulin)
„primer“ sense	0,5 µl
„primer“ antisense	0,5 µl
PCR Puffer 10x	2 µl
dNTPs	0,2 µl
MgCl ₂	1 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
RNase freies Wasser	14,7 µl (13,7 µl Tenomodulin)

Als endogene Kontrolle diente das von jeder Zelle exprimierte Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dieses Gen sollte weitgehend keiner Regulation durch exogene oder endogene Stimulationen unterliegen und somit konstant exprimiert werden. Die jeweils analysierten Gene konnten anschließend relativ auf die Expressionsstärke des Haushaltsgens bezogen werden. Als negative Kontrolle diente bei jedem Experiment je eine Probe bei der das Probenvolumen durch 1 µl RNase

freies Wasser ersetzt wurde. Als Differenzierungskontrolle zu anderen muskuloskelettalen Geweben diente die cDNA humaner Osteoblasten, Fibroblasten und Chondrozyten. Die Primersequenzen, sowie die Länge der jeweiligen Amplifikate können Tabelle 3 (S. 29) entnommen werden.

Für die genspezifische Amplifikation wurde folgendes Programm benutzt:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3 min	95°C	1
Amplifikation	30 sec	95°C	34
	45 sec	50-64°C	
	1 min	72°C	
Endpolymerisation	10 min	72°C	1
Ende		4°C	

Anschließend wurden die Proben für höchstens 2 Tage bei -4°C im Kühlschrank gelagert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Den theoretischen Ablauf eines Zykluses einer „polymerase chain reaction“ (PCR) verdeutlicht Abbildung 7.

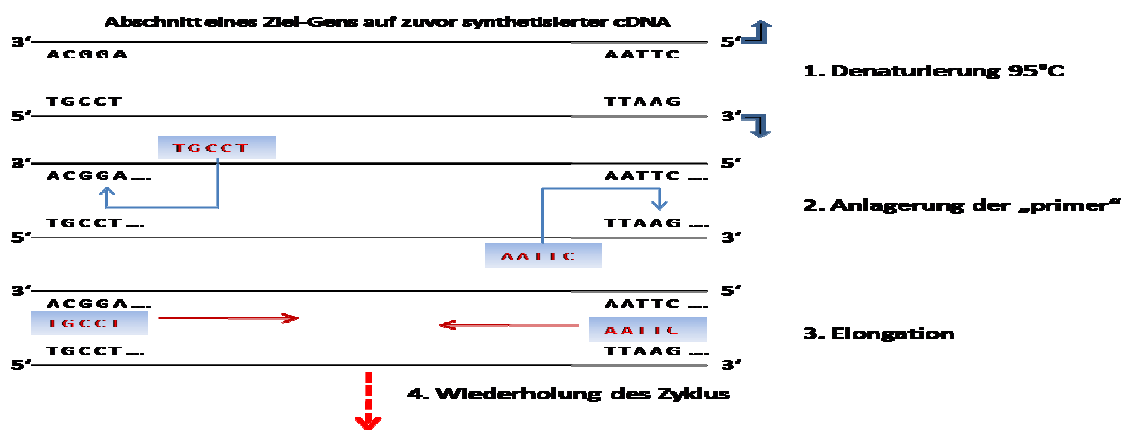


Abbildung 7: Der PCR Zyklus schematisch. Schematische Darstellung des Ablaufs eines RT-PCR Zyklus. Durch Wiederholung dieses Zyklus wächst die Anzahl der Amplifikate exponentiell.

2.2.2.3.2. real-time PCR

Um die Genexpression der einzelnen Gruppen vergleichend darstellen zu können, wurde für das Strukturprotein Kollagen Typ I ($\alpha 1$) und für das Proteoglycan Decorin eine real-time PCR durchgeführt. Die cDNA Transkripte wurden im Verhältnis 1:10 mit RNase freien Wassers verdünnt. Es wurden Primersets (Fi. Search LC, Heidelberg), die Primer, Standard Stabilisatoren, Standards und eine positive Kontrolle enthielten, benutzt. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde der Farbstoff Sybr Green I verwendet. Dieser Farbstoff

interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA und sorgt damit für einen proportionalen Anstieg des Fluoreszenzsignals in Bezug zu den PCR Amplifikaten während der exponentiellen Phase der PCR. Für einen real-time PCR Lauf wurde folgender Ansatz pipettiert:

cDNA (1:10 verdünnt)	10 µl
„primer“ (sense und antisense)	2 µl
SYBR Green I Mix (DNA Polymerase, Reaktions-Puffer, MgCl ₂ , dNTP und SYBR Green I dye)	2 µl
RNase freies Wasser	6 µl

Als Berechnungsgrundlage der Effizienz eines jeden Laufes dienten jeweils 3 Standardverdünnungen (10^0 - 10^{-2}), die je doppelt angesetzt wurden. Um die Vergleichbarkeit einzelner Experimente sicherzustellen, wurde ein Effizienzunterschied der einzelnen Läufe von 0,05 akzeptiert. Zur Durchführung der real-time PCR diente das Gerät LightCycler 2.0 System (Fi. Roche, Mannheim). Das verwendete Programm folgte nachstehenden Parametern:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	10 min	95°C	1
Amplifikation	10 sec	95°C	35
	10 sec	68°C	
	16 sec	72°C	

Jeder Lauf wurde mit einer negativen Kontrolle durchgeführt, in der das Probenvolumen durch 10 µl RNase freies Wasser ersetzt wurde. Am Ende jedes Experimentes wurde eine Schmelzkurvenanalyse erstellt, um spezifische Amplifikationen von möglichen Nebenprodukten unterscheiden zu können und somit die Reinheit der Amplifikate zu kontrollieren.

Als endogene Kontrolle diente das Haushaltsgen Cyclophilin B. Alle Proben wurden vor Durchführung der real-time PCR auf diesen Wert normiert, um folgend eine relative Quantifizierung der einzelnen Proben zu ermöglichen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Roche Molecular Biochemicals Light cycler software version 3.5 nach der „fit point“ Methode.

2.2.2.4. Agarose Gelelektrophorese

Die RT-PCR Amplifikate wurden zur Analyse auf Agarose-Gele aufgetragen. Zunächst wurden 10 ml TAE-Puffer mit 90 ml destilliertem Wasser versetzt. Für ein 2%iges Gel wurden dieser Mischung 2 g Agarose beigemischt und in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzer Abkühlzeit auf ca. 40-50°C wurden 2 µl Ethidium-Bromid (EtBr)-Lösung (10mg/ml) unter ständigem Rühren hinzugegeben. Nach dem Ausgießen in die Gelkammer wurde die Agarose für 30 min polymerisiert.

Die RT-PCR Amplifikate wurden mit 3 µl sechsfach konzentriertem „loading dye“ gemischt und je 12 µl der Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wurden 5 µl einer 100 bp Leiter in die benachbarten Taschen der Proben gegeben. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte schließlich durch Anlegen einer Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 66 mA für ca. 1,5 h.

Die Auswertung der aufgetrennten Amplifikate erfolgte mit dem Fluor-STM MultImager (Fi. Biorad, München) und der Software „Multianalyst“ version 1.1.

2.2.3. Zellzahlbestimmung auf den Vliesen

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität auf den Vliesen wurde die Methode nach Schmitt SC et al (140) modifiziert. Das biologische Vlies war zweischichtig, bestehend aus einem porösen Kollagengerüst mit einer einseitigen Verstärkungsmembran, um eine höhere Ausreißfestigkeit zu erreichen (Shoulder Patch, Fi. TETEC, Reutlingen). Zum anderen wurde ein Vlies auf ungefärbter PGA Basis verwendet, der einseitig durch einen PDS Film beschichtet wurde (Ethisorb, Fi. Ethicon®, Norderstedt).

Mit Hilfe einer sterilisierten Knochenbiopsiestanze (Durchmesser 8,5 mm) (Fi. Biomed®, Jena) wurden runde Stanzen aus den Vliesen entnommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Zellkulturmedium für 24 h im Brutschrank. Diese Maßnahme diente zum einen der Verbesserung der initialen Ernährungsbedingungen der Zellen auf den Vliesen und zum anderen sollte verhindert werden, dass die Vliese nach Besiedelung weitere Flüssigkeit aufnehmen konnten.

Mit einer sterilen Pinzette wurden die Vliese danach in 96-Well Platten mit flachem Boden umgesiedelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Vliese den Boden komplett bedeckten. Somit konnte sichergestellt werden, dass humane Tenozyten nicht neben den Vliesen adhärieren konnten.

Die zuvor kultivierten Tenozyten der vierten Passage (Bizepssehne) wurden durch Trypsinierung von den Kulturflaschen gelöst und anschließend mit Hilfe der Trypan Blau Methode gezählt (s. 2.2.1.3, S. 33). Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert. Schließlich wurden 2×10^4 Zellen in einem Gesamtvolumen von 20 µl

vorsichtig auf die Vliese pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation für 2 h im Brutschrank, um die Tenozyten auf den Vliesen adhären zu lassen. Nun wurde das Volumen durch Zugabe von Zellkulturmedium auf 200 µl ergänzt. 100 µl Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage durch frisches Medium ersetzt. Als Kontrolle dienten adhären Tenozyten in gleicher Zellzahl, unbesiedelte Vliese sowie reines Zellkulturmedium.

Die besiedelten Vliese wurden nach 48 h und 2 Wochen in Doublets ausgewertet. Hierfür wurden 20 µl des Gesamtvolumens (200 µl) abpipettiert und durch das gleiche Volumen (20 µl) WST-1 Reagenz (water soluble tetrazolium) ersetzt. Durch erneute Inkubation für 2 h im Brutschrank konnten die Mitochondrien lebender Tenozyten durch ihr intaktes Dehydrogenasen System das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene Disulphonat) in den wasserlöslichen dunkelroten Farbstoff Formazan umsetzen. Diesen Vorgang verdeutlicht schematisch Abbildung 8.

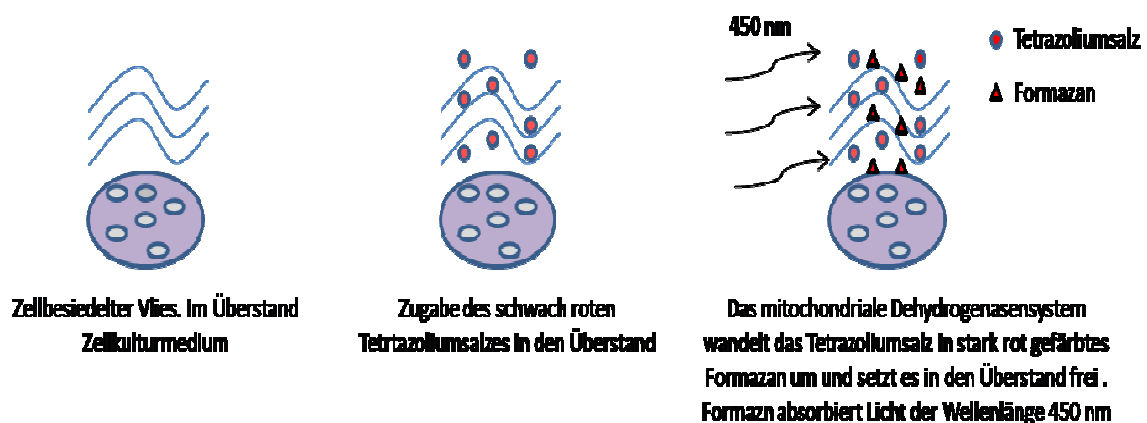


Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Absorptionsmessung schematisch. schematische Darstellung des Versuchsaufbaues zur Bestimmung der Zellvitalität auf zellbesiedelten Vliesen. Nur vitale Zellen sind in der Lage, das Tetrazoliumsalz in wasserlösliches Formazan umzuwandeln. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm.

Um das Formazan homogen im Überstand zu verteilen, wurde die 96-Well Platte für 3 min mit 500 rpm mit dem MTS4 Schüttler (Fi. IKA Labortechnik®, Staufen i.Br.) bewegt. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes in eine neue 96-Well Platte überführt und danach spektralphotometrisch durch den microplate reader E_{max} (Fi. MWG Biotech®, München) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

Anschließend wurden die ermittelten optischen Dichtewerte anhand einer Standardkurve, die mittels Tenozyten gleicher Isolationsmethode, Ausgangsgewebes und Zellpassage erstellt wurde, in absolute Zellzahlen umgerechnet.

2.2.4. biomechanische Prüfung der Fadenausreißkraft

Die Vliese wurden für 56 h in Zellkulturmedium vorinkubiert. Diese Zeit entspricht der Zeitspanne, die minimal nötig wäre, um eine Zellbesiedelung der Vliese *in vitro* vorzunehmen, die Zellen auf den Vliesen adhären zu lassen und die Vliese schließlich zu implantieren. Innerhalb dieser Zeitspanne ist von keiner wesentlichen Festigkeitsveränderung der Vliese durch Produktion an EZM der Tenozyten auszugehen, so dass die ermittelten Ausreißkräfte ungefähr denen zellbesiedelter Vliese entsprechen. Nun wurden die Vliese mit Hilfe eines Lineals und eines Skalpells in 0,5 cm breite Streifen geschnitten. Um eine rechteckige Form auch bei den Kollagenvliesen zu erreichen, wurden die beiden abgerundeten Enden durch einen horizontalen Schnitt abgetrennt. Somit hatten die verwendeten Vliese die gleiche geometrische Form.



Abbildung 9: Präparation eines Vlieses vor dem Anbringen einer U-Naht. Präparation eines Kollagenvlieses in 0,5 cm lange Streifen. Das Lineal wurde vertikal positioniert und die Vliese mit einem Skalpell scharfkantig durchtrennt.

Anschließend wurde eine U-Naht Befestigung mit Hilfe eines Nadelhalters im Abstand von mindestens 0,7 cm zur jeweiligen Kante angebracht. Der Abstand zwischen den beiden Einstichsstellen betrug ca. 0,3 cm. Als Nahtmaterial wurde Ethibond EXCEL (Ethicon, Norderstedt), ein nicht resorbierbares Faden der Fadenstärke 2 (22 mm) verwendet. Der Faden wurde an beiden Enden mit jeweils 3 Knoten zusammengeführt und eine Schlaufe belassen. Somit konnten die präparierten Proben später in die Testmaschine eingespannt werden. Entsprach ein Einstich nicht den oben genannten Kriterien wurde die Probe verworfen. Dies war nötig, da mit einem zweiten Einstich der gesetzte Defekt vergrößert, und die zu testende Primärstabilität beeinflussen werden würde. In Abbildung 10 wird die Stichführung zum Anbringen einer U-Naht Befestigung gezeigt.

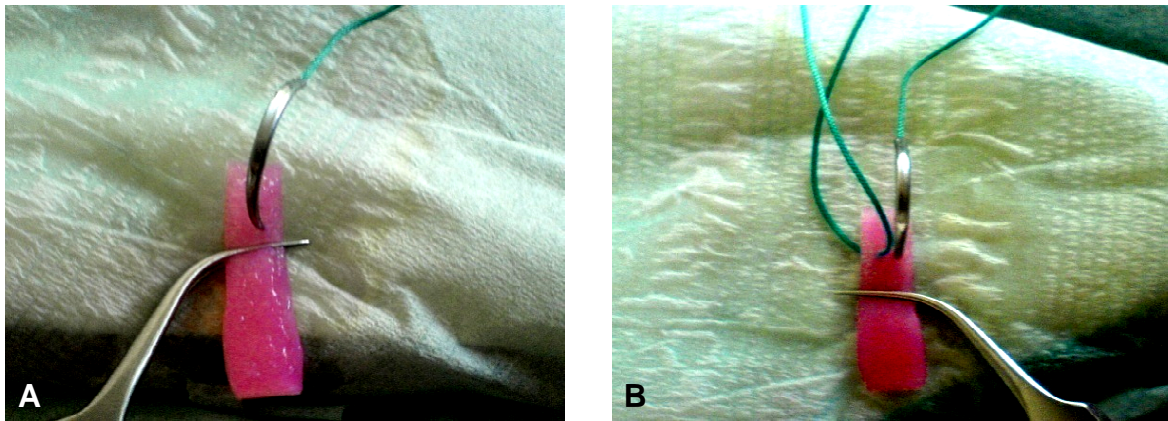


Abbildung 10: Darstellung eines U-Naht Stiches. Anbringen einer U-Naht an einem Kollagenvlies. Erster Einstich ca. 0,7 cm von der oberen Kante entfernt. Zweiter Einstich im Abstand von ca. 0,3 cm zur ersten Einstichstelle.

A: erster Stich einer U-Naht ca. 0,7 cm Abstand zur oberen Kante

B: Zweiter Einstich in gleicher Höhe mit einem Abstand von ca. 0,3-0,5 cm vom ersten Einstich entfernt

Die Fadenenden wurden beidseitig zu einer Schlaufe verknötet und um zwei Gewindeschrauben (Stärke 8) geführt. Diese Schrauben wurden anschließend in vorgebohrte Löcher eines Metallring eingeführt und dieser in die Zwick Universaltestmaschine Z010 (Fi. Zwick/Roell, Ulm) eingespannt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zugkraft, die an beiden Vliesenden wirkte, axial zum eingespannten Vlies angreifen konnte.

Die Prüfgeschwindigkeit betrug 8 mm/min. Es wurde keine Vorkraft angefahren, so dass auch schon kleinste Kraftzunahmen im Prüfprotokoll aufgezeichnet wurden.

2.2.5. Histologie

2.2.5.1. Besiedelung der Vliese mit humanen Tenozyten

In einem Erlenmeyer Kolben wurde TAE-Puffer mit Agarose (1%) angerührt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend wurde der Erlenmeyer Kolben mit Alufolie bedeckt und die noch kochende Agarose unter die Sterilwerkbank transportiert. Je 1 ml wurde in 24-Well Platten ausgegossen und für 24 h bei Raumtemperatur unter der Sterilwerkbank auspolymerisiert. Diese Maßnahme sollte verhindern, dass es bei der Besiedelung der Vliese zu einem Anheften der Tenozyten am Boden der 24-Well Platten kommen konnte.

Für die histologische Auswertung wurden ca. 0,5x0,5 cm große Stücke mit einer sterilen Schere aus den Vliesen ausgeschnitten und in die vorbereiteten 24-Well Platten gelegt. Es folgte eine Inkubation in Zellkulturmedium für 24 h im Brutschrank. Nun wurde das Kulturmedium vollständig abpipettiert und 3×10^4 Zellen in einem Volumen von 50 µl Zellkulturmedium vorsichtig auf die Vliese gegeben. Danach wurden die 24-Well Platten mit dem Certomat MO II (Fi. Sartorius®, Göttingen) für 5 min bei 200 rpm bewegt, um eine

homogene Verteilung der Zellen in den Vliesen zu erreichen. Es folgte eine erneute Inkubation im Brutschrank für 2 h, um die Tenozyten nun letztlich auf den Vliesen adhärent werden zu lassen. Anschließend wurde Zellkulturmedium zugegeben, um ein Gesamtvolumen von 1,5 ml zu erreichen.

Die histologische Auswertung der zellbesiedelten Vliese erfolgte nach 48 h und nach zwei Wochen (14 Tagen) in Doublets. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Als Kontrolle diente je ein nicht zellbesiedelter Vlies.

2.2.5.2. Einbetten und Schneiden der zellbesiedelten Vliese

Die Vliese wurden vorsichtig aus dem Kulturmedium genommen und zweimal mit PBS gewaschen. Um eine bessere Verklebung zwischen Zellen und Vliesen zu erreichen, wurde eine Inkubation in 5%-iger Sucrose für 30 min bei -4°C vorgenommen. Anschließend wurden die Biopsieschalen luftblasenfrei mit TissueTek gefüllt und die Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Mit dem Kryotom CM 3050 (Fi. Leica, Bensheim) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern aufgetragen. Um eine stärkere Fixierung der Schnitte auf den Objektträgern zu erzielen, folgte eine Lagerung für 5 min bei 50°C auf einer Wärmeplatte. Anschließend wurden die Objektträger mit den Präparaten in Alufolien eingewickelt und bei -20°C zwischengelagert.

2.2.5.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung.) der Schnitte

Die Schnitte wurden aus dem Gefrierschrank genommen und aufgetaut. Danach folgte eine Inkubation für 5 min in Hämatoxylin. Nun wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser farblos war. Es folgte eine Gegenfärbung mit Eosin für 1,5 min, um kationische, eosinophile Strukturen zu färben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und folgend zweimalig in Xylol geklärt. Als Eindeckmittel wurde Eukitt (Fi. O. Kindler GmbH®, Freiburg) verwendet. Es folgte die Trocknung der Schnitte für 24 h. Schließlich wurden repräsentative Aufnahmen der gefärbten Schnitte mit der Axio Cam MRc 5 angefertigt.

2.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch nicht parametrische Testverfahren. Die Ergebnisse wurden als Median mit unterem und oberem Quartil (Boxplot) bzw. Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Es wurde ein Kruskal Wallis Test durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den 3 primären Ausgangsgeweben festzustellen. Anschließend wurde ein Dunn's post Test verwendet, um Unterschiede in den Versuchsgruppen zu quantifizieren. Wurden Daten des gleichen Ausgangsgewebes auf statistische Signifikanz hinsichtlich der unterschiedlichen Isolationstechniken verglichen, wurde ein Mann-Whitney Test verwendet.

Um Daten identischer Zellen zu zwei differenten Zeitpunkten auf statistisch signifikante Unterschiede zu prüfen, wurde ein Wilcoxon-paired Test durchgeführt.

Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant, ein Wert von $p < 0,01$ als statistisch hochsignifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Zellausbeute

Vor jeder Zellisolation wurde die eingesetzte Gewebemenge bestimmt und anschließend auf die gewonnene Zellzahl bezogen. Bei der Zellisolation durch sukzessive ZAW wurden für das anteriore Kreuzband $0,27 \text{ g} \pm 0,23 \text{ g}$, für die Bizepssehne $0,11 \text{ g} \pm 0,10 \text{ g}$ und für die Semitendinosussehne $1,66 \text{ g} \pm 1,94 \text{ g}$ an humanem Ausgangsgewebe eingesetzt. Nach ca. 6-8 Wochen konnten ungefähr 75×10^3 Zellen aus dem jeweiligen Spendergewebe generiert werden.

Bei der Zellisolation durch EGV wurden für das anteriore Kreuzband $0,68 \text{ g} \pm 0,29 \text{ g}$, für die Bizepssehne $0,34 \text{ g} \pm 0,20 \text{ g}$ und für die Semitendinosussehne $0,84 \text{ g} \pm 0,47 \text{ g}$ eingesetzt. Die höhere Menge an verwendetem Gewebe für die Zellisolationen durch EGV, als für die Zellisolationen durch ZAW, wurde gewählt, um einem erwarteten höheren Verlust vitaler Zellen durch die enzymatische Destruktion im Vergleich zu dem schonenderem Isolationsverfahren der sukzessiven ZAW entgegenzuwirken.

Es zeigte sich, dass durch die EGV deutlich mehr Zellen in kürzerer Zeit (\emptyset Verdauungszeit: 17 h) gewonnen werden konnten. Dabei konnte bezogen auf den Gewebeeinsatz aus vorderen Kreuzbändern sowie aus Bizepssehnen (Biopsien älterer Spender) eine größere Zellausbeute generiert werden als aus Semitendinosussehnen, die von jüngeren Spendern stammten. Berücksichtigt man die eingesetzte Gewebemasse, so konnte aus vorderen Kreuzbändern die größte Zellmenge isoliert werden. So lag die durchschnittliche Zellausbeute aus den vorderen Kreuzbändern um den Faktor 76,9 über der aus Biopsien der Semitendinosussehne jüngerer Spender ($p < 0,01$). Auch aus Bizepssehnen konnten mehr Zellen gewonnen werden als aus Semitendinosussehnen. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

Der Unterschied in der Zellausbeute zwischen den Biopsien aus der Bizepssehne und dem VKB älterer Spender war ebenfalls nicht signifikant. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 11 zusammengefasst.

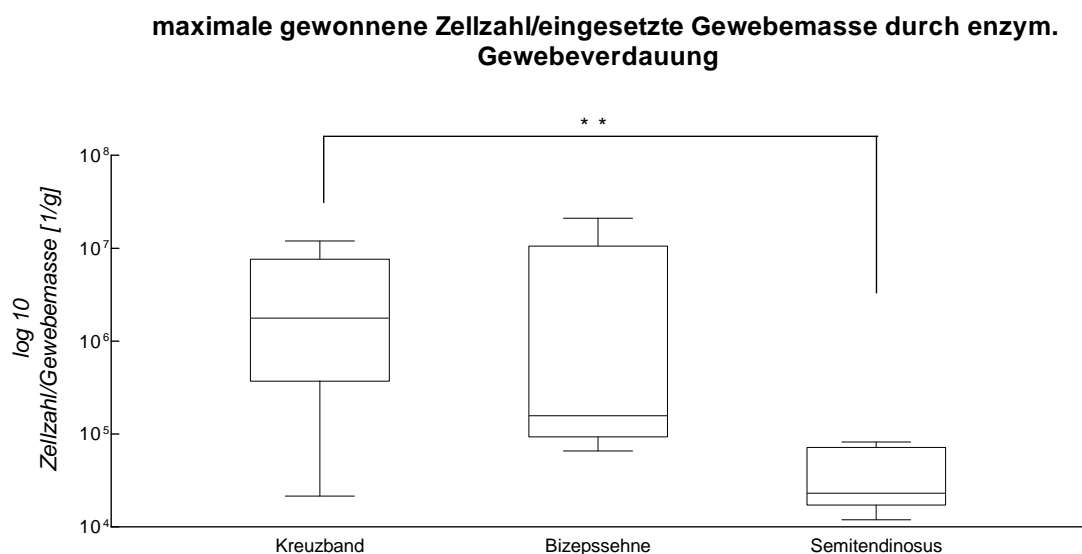


Abbildung 11: Zellausbeute nach EGV. Die durch enzymatische Gewebeverdauung gewonnene Zellzahl wurde auf die eingesetzte Gewebemenge bezogen (n=7). **p<0,01 (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test)

3.2 Zellmorphologie der primären Zellkulturen

Bei der Zellisolation durch Zellauswanderung konnten nach ca. einer Woche erste vereinzelte tenozytenartige Zellen mit langer spindelförmiger Morphologie um das nativen Geweben beobachtet werden (s. Abb. 12 A). Mit zunehmender Kultivierungszeit stieg die Zahl der migrierten tenozytenartigen Zellen um das Ausgangsgewebe und die Zelldichte erreichte nach ca. 3 Wochen eine Konfluenz von ca. 90%. Zuerst konnten einige Tenozyten in der Umgebung der nativen Sehenstücke beobachtet werden, später bildeten sich einzelne proliferierende Zellverbände. Außerdem konnte deutlich die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten mit zunehmender Konfluenz beobachtet werden (s. Abb. 12 C/D).

Der Prozess der Zellauswanderung beschleunigte sich in den folgenden Auswanderungszyklen. Nach Umbettung in neue Petri-Schalen waren bereits nach 2-3 Tagen erneut adhärente tenozytenartige Zellen zu sehen, die nach ca. einer Woche wieder eine Konfluenz von 90% erreichten (s. Abb. 12). Die Morphologie sowie die Zellzahl, die aus den nativen Sehnenstücken gewonnen werden konnte, entsprachen während dieser Auswanderungszyklen grob den Beobachtungen vorheriger Zyklen. Auch eine zunehmende Seneszenz, die eine verminderte Proliferationsrate bewirken würde, konnte nicht bemerkt werden. Abbildung 12 stellt die Zellmigration während eines solchen Auswanderungszykluses chronologisch dar.

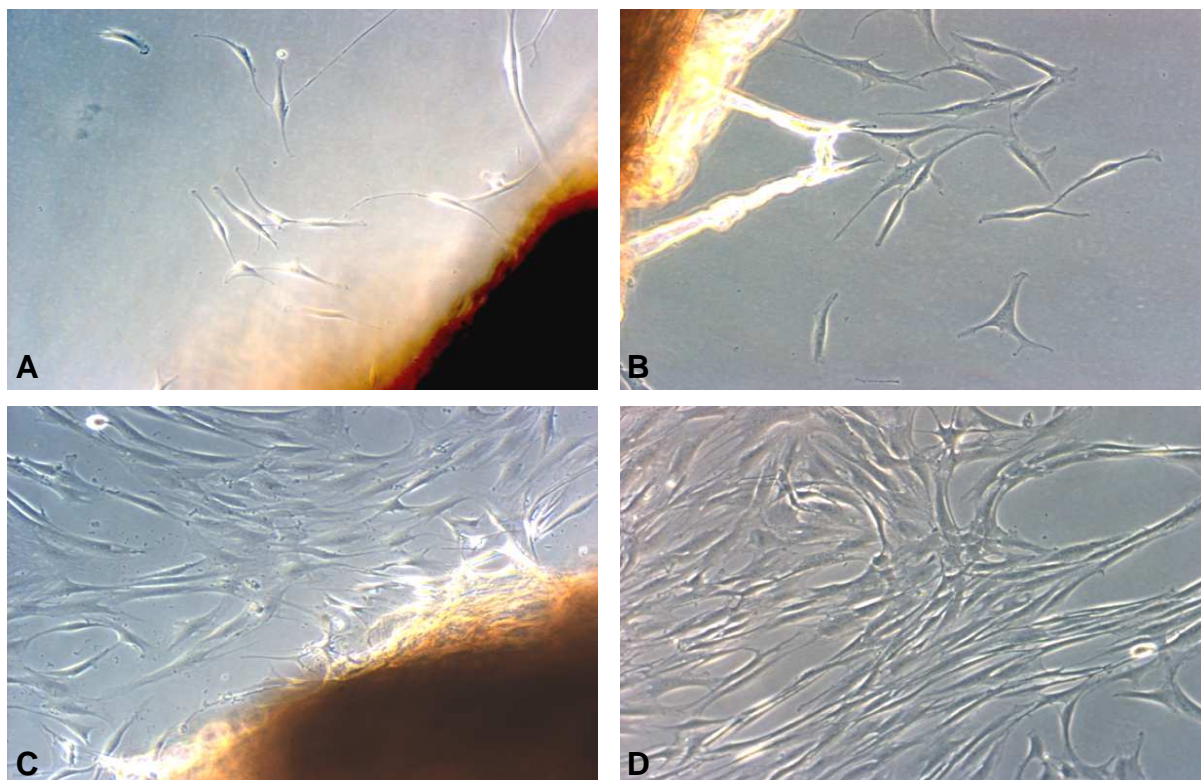


Abbildung 12: Chronologie der Zellauswanderung. Zellisolation durch ZAW (1. Auswanderungszyklus) in Petri-Schalen am Beispiel einer Biopsie des vorderen Kreuzbandes (Vergrößerung: 10x). Zu sehen sind die nativen Sehnenstücke sowie aus ihnen migrierende Tenozyten. Für die weiteren Gewebearten verlief die ZAW analog. Die Bildung eines proliferierenden Zellverbandes und die zunehmende Ausbildung von Zell-Zellkontakten sind zu beobachten.

A: nach 8 Tagen
 B: nach 11 Tagen
 C: nach 16 Tagen
 D: nach 22 Tagen

Nach zweimaligen Passagieren der primären Zellkulturen zeigte sich sowohl in den durch ZAW als auch in den durch EGV gewonnenen primären Tenozytenkulturen eine zunehmende Anzahl von morphologisch dedifferenziert erscheinenden Zellen. Diese stellten sich als große abgerundete Zellen dar, die vereinzelt zwischen weiterhin spindelförmigen, tenozytenähnlichen Zellen lagen. Ihr Zytoplasma sowie ihr Zellkern waren gegenüber der schlanken elongierten tenogenen Zellmorphologie deutlich verbreitert. Es konnte beobachtet werden, dass auch diese Zellen Zellkontakte mit elongierten, spindelförmigen Zellen besaßen. Ihre Anzahl nahm mit zunehmender Kultivierungszeit und Zellpassage in allen Zellkulturen zu. Abbildung 13 verdeutlicht das Auftreten dieser vereinzelt auftretenden, dedifferenziert erscheinenden Zellen in den verschiedenen Tenozytenkulturen, gewonnen sowohl durch ZAW als auch durch EGV.

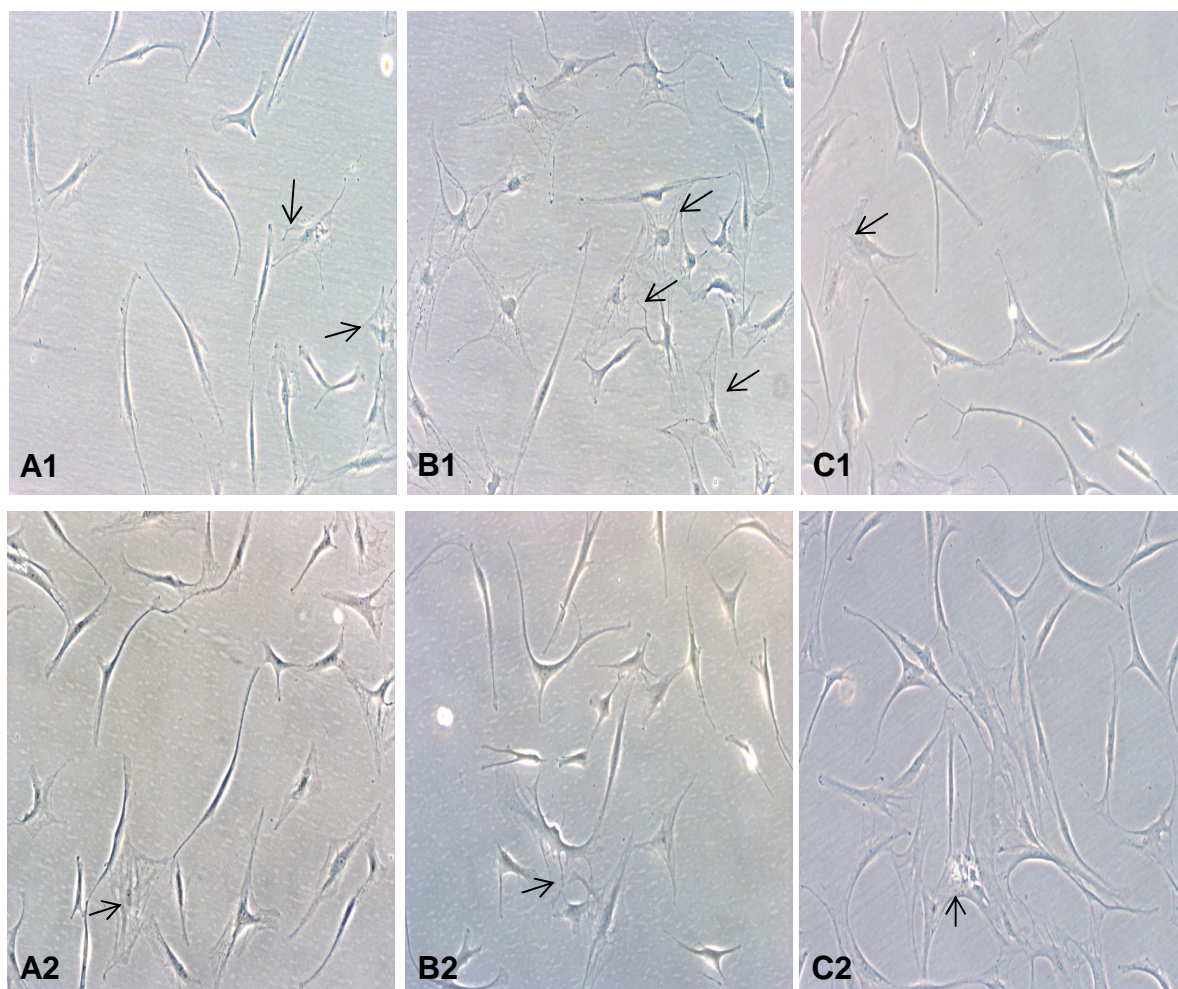


Abbildung 13: primäre Tenozytenkulturen Passage 3. primäre Tenozytenkulturen der dritten Zellpassage. A: anteriores Kreuzband. B: Bizepssehne. C: Semitendinosussehne. 1: EGV. 2: ZAW. Die Pfeile deuten auf dedifferenzierte abgerundete Zellen die neben tenozytenartigen elongierten Zellen zum Liegen kommen. (Vergrößerung:10x)

Mikroskopisch schien der Anteil an dedifferenzierten Zellen in Zellkulturen, die primär durch EGV gewonnen worden waren, tendenziell höher zu sein. Um dies zu verdeutlichen, wurden bei 10-facher Vergrößerung aus je 4 Kulturen aller Ausgangsgewebe der dritten Zellpassage je 2 Gesichtsfelder ausgezählt und der Anteil morphologisch dedifferenziert erscheinender Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Dabei wurde in jedem Gesichtsfeld eine Gesamtzellzahl von mindestens 10 und höchstens 30 Zellen gefordert. Abbildung 14 stellt die Ergebnisse der Auszählung der einzelnen Tenozytenkulturen graphisch dar.

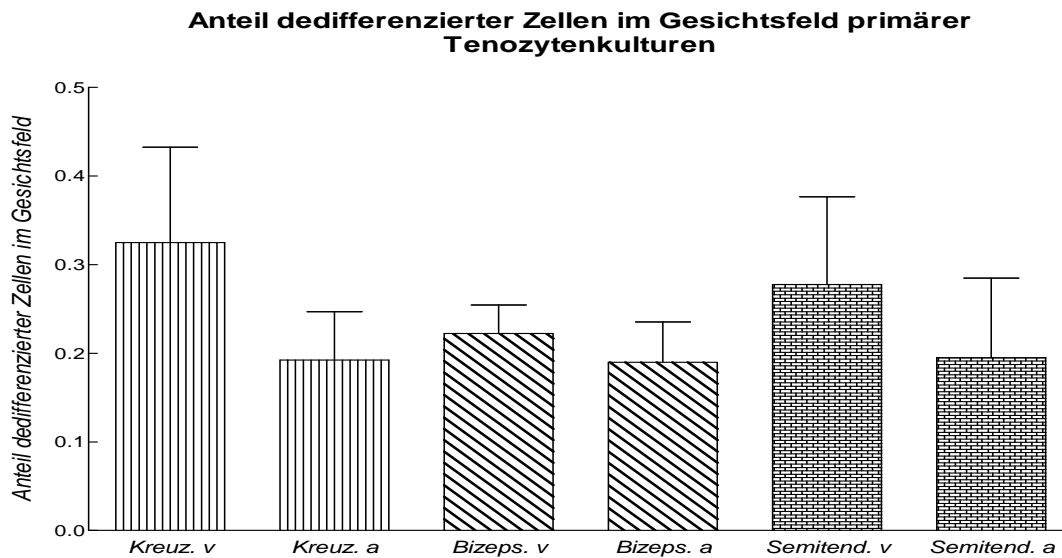


Abbildung 14: Anteil dedifferenzierter Zellen im Gesichtsfeld. Anteil dedifferenzierter Zellen im Gesichtsfeld primärer Tenozytenkulturen (Zellpassage 3). Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung.

Kreuz.: anteriores Kreuzband. Bizeps.: Bizepssehne. Semitend.: Semitendinosussehne. v: enzymatische Gewebeverdaauung. a: Zellauswanderung. (n=4)

Der höchste Anteil dedifferenzierter Zellen pro Gesichtsfeld wurde unabhängig vom verwendeten Ausgangsgewebe in Kulturen, die durch EGV gewonnen wurden, gefunden. Die Werte lagen auch im Durchschnitt stets über den Vergleichswerten von Kulturen, deren Zellen durch ZAW isoliert worden waren (s. Abb. 14). Diese Ergebnisse korrelierten mit den Beobachtungen, die primär nur bei Kontrolle der Zellkulturen während des Wechsels des Zellkulturmediums unter dem Lichtmikroskop wahrgenommen wurden. Es handelte sich hierbei jedoch lediglich um eine Tendenz ohne statistische Signifikanz.

Die Feststellung eines höheren Anteils dedifferenzierter Zellen in Kulturen nach EGV war möglicherweise auf den Kontakt der Tenozyten mit dem Enzym Kollagenase I während des Isolationsvorganges zurück zuführen. Um Hinweise für diese Hypothese zu erhalten wurde eine Zytotoxizitätsanalyse dieses Enzyms durchgeführt.

3.3 Zytotoxizitätsanalyse des Enzyms Kollagenase I

Um die Zytotoxizität des bei der EGV verwendeten Enzyms Kollagenase I abschätzen zu können, wurden humane Fibroblasten für 0,5 h bzw. 2 h in 0,2%iger Enzymlösung inkubiert und anschließend ausgezählt. Durch diesen Versuch sollten die Folgen des enzymatischen Einflusses während der Gewebeverdaauung auf die Zellvitalität abgeschätzt und eine mögliche Erklärungsgrundlage für die differente Zellmorphologie der primären Zellkulturen geliefert werden.

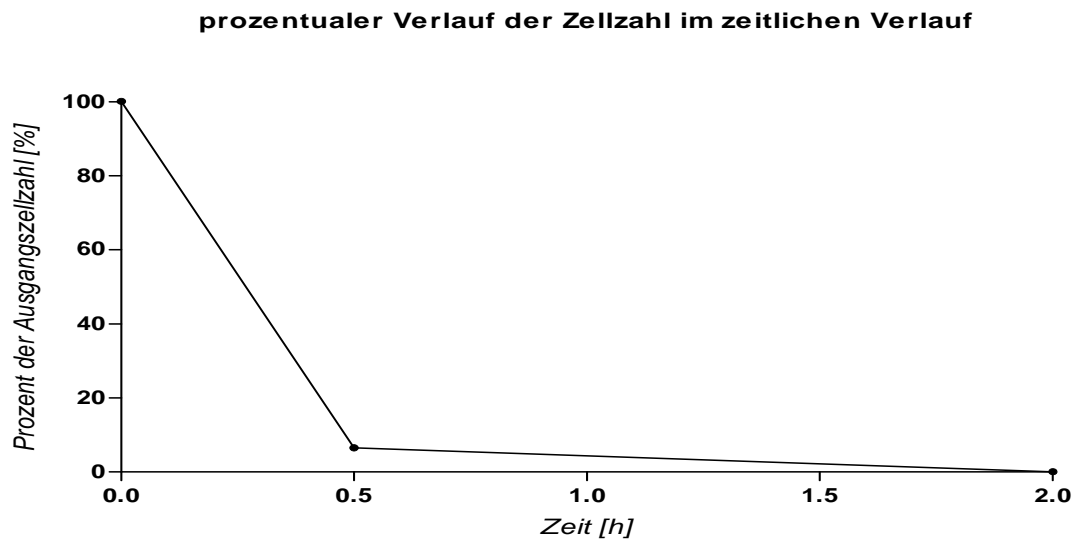


Abbildung 15: Überlebensrate von Fibroblasten in Kollagenase I. prozentualer Verlauf überlebender humaner Fibroblasten (Zellpassage 2; Ausgangszellzahl 10^5) in 0,2%iger Kollagenase I Lösung (n=6)

Die Zellzahl verringerte sich bereits nach 0,5 h auf $6,5\% \pm 2,05\%$ des Ausgangswertes von 1×10^5 Fibroblasten. Nach 2 h konnten mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und der Trypanblau Zählmethode (s. 2.2.1.3 S. 33) keine vitalen Fibroblasten mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 15).

Nach der mikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie in den *in vitro* Kulturen durch die unterschiedlichen Isolationsverfahren, wurde eine weiterführende molekularbiologische Analyse der Tenozytenkulturen durchgeführt.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 Expressionsverhalten wichtiger Strukturproteine

Um Unterschiede im Differenzierungsgrad und im Expressionsmuster der einzelnen Gewebe nach den unterschiedlichen Isolationsmethoden zu untersuchen, wurde in der dritten Zellpassage die Expression wichtiger Strukturproteine und Differenzierungsmaker mit Hilfe der RT-PCR analysiert.

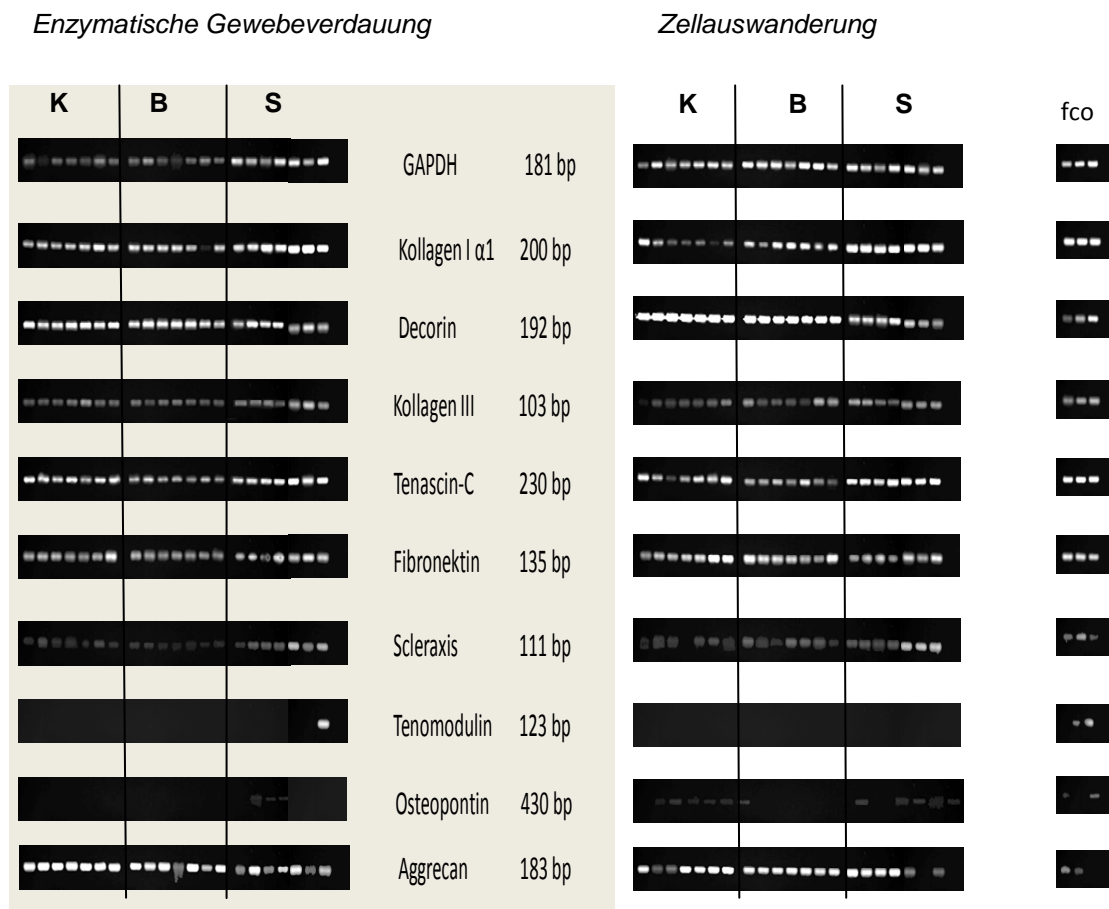


Abbildung 16: Genexpression von Tenozyten. Gezeigt sind die Ergebnisse der RT-PCR Auswertungen auf 2%igen Agarosegelen primärer Tenozytenkulturen (Zellpassage 3). Die Expression wichtiger Strukturproteine sowie osteogener (Osteopontin) und chondrogener (Aggrecan) Dedifferenzierungsmaker sind dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH.
K: anteriores Kreuzband B: Bizepssehne S: Semitendinosus. Kontrollen: f=Fibroblasten (Passage 6) c: Chondrozyten (primäre Kultur Passage 3) o=Osteoblasten (Passage 2)

Die wichtigen Strukturproteine des Sehnengewebes wie Kollagen Typ I, Decorin sowie Kollagen Typ III wurden von allen Tenozyten der primären Ausgangsgewebe durchgängig exprimiert. Insbesondere zeigt das Proteoglykan Decorin in den Tenozytenkulturen eine höhere Expression als in Zellarten anderen muskuloskelettalen Ursprungs (Kontrollen: Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten) (s. Abb. 16 Zeilen 2-4).

Sowohl die Expression von Tenascin-C als auch von Fibronectin, zwei Glykoproteinen, die für die Zell-Matrix Interaktion wesentlich sind, war in allen primären Tenozytenkulturen durchgängig nachweisbar und von etwa gleicher Stärke wie in den Kontrollen (s. Abb. 16 Zeile 5-6).

Scleraxis als tenogener Differenzierungsmaker konnte ebenfalls in fast allen Tenozytenkulturen nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme stellte die Probe eines anterioren Kreuzbandes dar, bei dem die Zellisolation durch ZAW durchgeführt worden war. Die Expression des Transkriptionsfaktors Scleraxis wurde auch in den anderen Zellkulturen muskuloskelettalen Ursprungs (Kontrollen: Fibroblasten, Chondrozyten und

Osteoblasten) nachgewiesen, wenngleich tendenziell in geringerer Stärke (s. Abb. 16 Zeile 7).

Ein wichtiger Differenzierungsmaker für tenogenes Gewebe ist das Transmembranprotein Tenomodulin. Seine Expression konnte lediglich in einer Tenozytenkultur der dritten Zellpassage nachgewiesen werden, deren Zellen aus einer Semitendinosussehne stammten, die durch EGV gewonnen worden war. In den Kontrollkulturen konnte eine schwache Tenomodulinexpression in Chondrozyten und Osteoblasten nachgewiesen werden (s. Abb. 16 Zeile 8).

Ein charakteristisches Protein für Knochengewebe ist Osteopontin. Zellkulturen von drei Semitendinosussehnen, deren Tenozyten durch EGV isoliert worden waren, exprimierten dieses Protein. Bei Zellen die durch ZAW isoliert worden waren, zeigte sich in sechs von sieben Fällen des anterioren Kreuzbandes, bei einer von sieben Bizepssehnen und bei fünf der sieben Semitendinosussehnen ein positives Expressionsverhalten für dieses Strukturprotein. In den Kontrollkulturen exprimierten Fibroblasten dieses Protein nur schwach und Osteoblasten dieses Protein stärker als die Tenozytenkulturen, wogegen der Nachweis in Chondrozyten negativ blieb (s. Abb. 16 Zeile 9).

Aggrecan als Protein der EZM, wird insbesondere in Knorpelgewebe exprimiert. Bis auf eine Ausnahme (Semitendinosussehne; ZAW) konnte die mRNA Expression dieses Proteins in allen primären Tenozytenkulturen nachgewiesen werden. In den Kontrollkulturen exprimierten Chondrozyten und schwach auch Fibroblasten dieses Protein, Osteoblasten waren negativ (s. Abb. 16 Zeile 10).

3.4.2 quantitative mRNA Analyse von Kollagen Typ I und Decorin

Kollagen Typ I und Decorin sind zwei wesentliche Strukturproteine der EZM. Sie sind wichtig für die Bildung von funktionell hochwertigem tenogenem Gewebe *in vitro* sowie *in vivo*. Um Unterschiede im Expressionsverhalten dieser beiden wichtigen Proteine in den einzelnen Versuchsgruppen festzustellen, wurde für diese beiden Strukturproteine ein quantitativer Vergleich des mRNA Gehaltes durchgeführt. Die RNA wurde aus den primären Tenozytenkulturen extrahiert. In den folgenden Abbildungen 17 und 18 sind die Ergebnisse der quantitativen mRNA Bestimmung relativ zu dem „Haushaltsgen“ Cyclophilin B zusammengefasst.

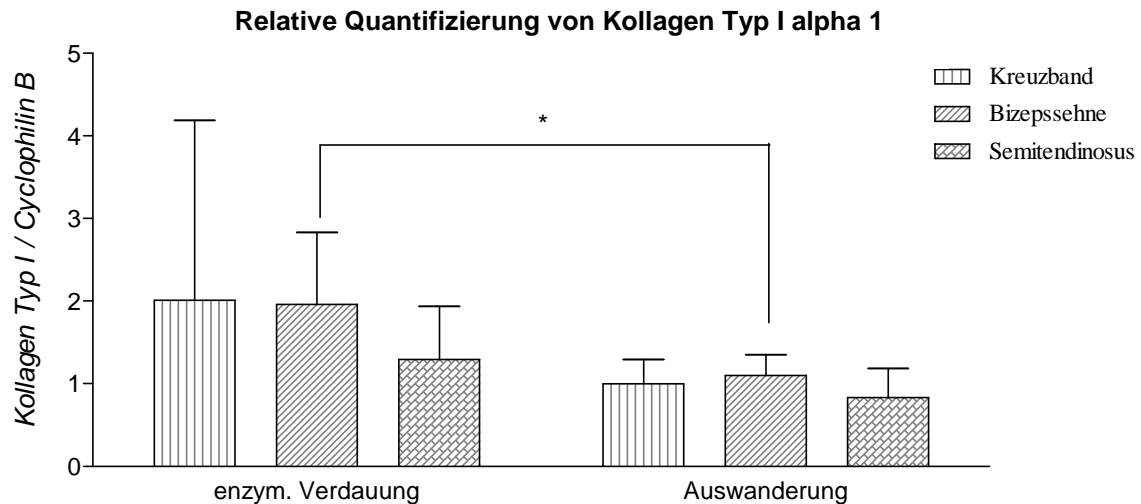


Abbildung 17: relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Kollagen Typ I alpha I. relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Kollagen Typ I alpha I in Relation zu Cyclophilin B. Die RNA wurde aus primären Tenozytenkulturen (Zellpassage 3) isoliert. (n=7). * $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test)

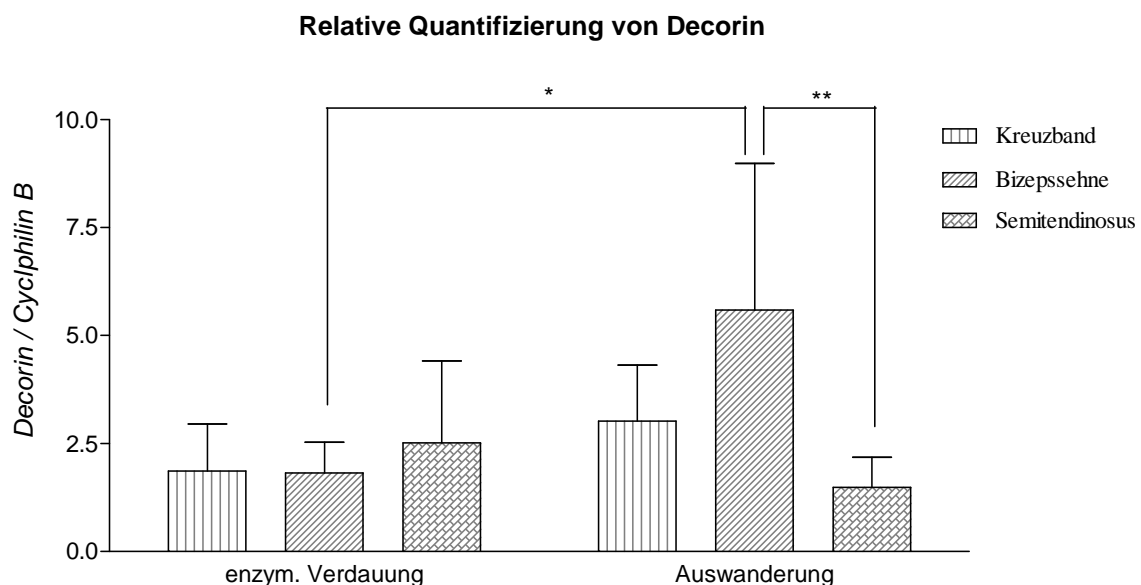


Abbildung 18: relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Decorin. relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Decorin in Relation zu Cyclophilin B. Die RNA wurde aus primären Tenozytenkulturen (Zellpassage 3) isoliert. (n=7). * $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test). ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test).

Zellen der Bizepssehne, die durch EGV isoliert worden waren, zeigten einen höheren mRNA Gehalt an Kollagen Typ I verglichen mit Proben desselben Ausgangsmaterials aber ZAW als Isolationsmethode ($p < 0,05$) (s. Abb. 17). Allerdings war der mRNA Gehalt an Decorin in Zellkulturen der Bizepssehne als primäres Ausgangsgewebe höher, wenn diese durch ZAW anstatt durch EGV gewonnen worden waren ($p < 0,05$) (s. Abb. 18). Wurden die beiden unterschiedlichen Zellisolationsmethoden in Zellkulturen der anderen primären Ausgangsgewebe (anteriores Kreuzband und Semitendinosussehne) verglichen, zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie bei der Bizepssehne, aber ohne statistische

Signifikanz. Tendenziell war die Expression an Kollagen I Typ I in allen Zellkulturen, die durch EGV gewonnen worden waren, höher, während die Expression an Decorin in Zellkulturen, deren Zellen durch ZAW gewonnen worden waren, höher lag. Die einzige Ausnahme dieser Beobachtung stellten Zellkulturen der Semitendinosussehne in Bezug auf ihr Decorinexpressionsniveau dar (s. Abb. 18).

Wurden die unterschiedlichen primären Ausgangsgewebe miteinander verglichen, konnte eine signifikant höhere Expression an Decorin in Zellkulturen der Bizepssehne verglichen mit Zellkulturen der Semitendinosussehne festgestellt werden, wenn beide Kulturen durch ZAW aus dem Ausgangsgewebe gewonnen wurden ($p < 0,01$) (s. Abb. 18). Die Expression an Kollagen Typ I war hingegen in allen Untersuchungsgruppen ungefähr identisch (s. Abb. 17).

Das Expressionsniveau von Kollagen Typ I und Decorin in Zellkulturen der Bizepssehne und des vorderen Kreuzbandes, die durch EGV isoliert worden waren, war tendenziell gleich. Das Kollagen Typ I Expressionsniveau in Vergleichskulturen der Semitendinosussehne lag tendenziell unter dem der anderen beiden Ausgangsgewebe (s. Abb. 17), das Decorin Expressionsniveau war jedoch etwas höher (s. Abb. 18).

Die anschließend durchgeführten Besiedelungsexperimente wurden mit Zellkulturen der Bizepssehne (gewonnen durch ZAW) der vierten Zellpassage durchgeführt.

3.5 Bestimmung der Zellproliferation auf Vliesen

Die Ermittlung der primären Zellausbeute aus den unterschiedlichen Geweben hatte gezeigt, dass aus Biopsien der Bizepssehne die höchsten durchschnittlichen Zellzahlen isoliert werden konnten (s. Abb. 11). Außerdem besaßen die Tenozytenkulturen der Bizepssehne die höchsten Durchschnittswerte im Expressionsverhalten wichtiger Strukturgene (s. Abb. 17 und 18). Desweiteren konnte ein tendenziell geringerer Anteil morphologisch veränderter Zellen in Kulturen, die durch ZAW gewonnen wurden, festgestellt werden (s. Abb. 14). Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente zur Zellproliferation ausschließlich mit Zellen durchgeführt, die durch ZAW aus der Bizepssehne isoliert worden waren.

Tenozyten der vierten Passage (2×10^4) wurden auf zuvor ausgestanzten Vliesen angesiedelt und anschließend in 6-well Platten kultiviert. Die Auswertung erfolgte nach 2 Tagen und 14 Tagen durch Messung der Extinktion des Überstandes bei einer Wellenlänge von 450 nm. Schematisch ist die Extinktionsmessung in Abbildung 8 (S. 40) abgebildet.

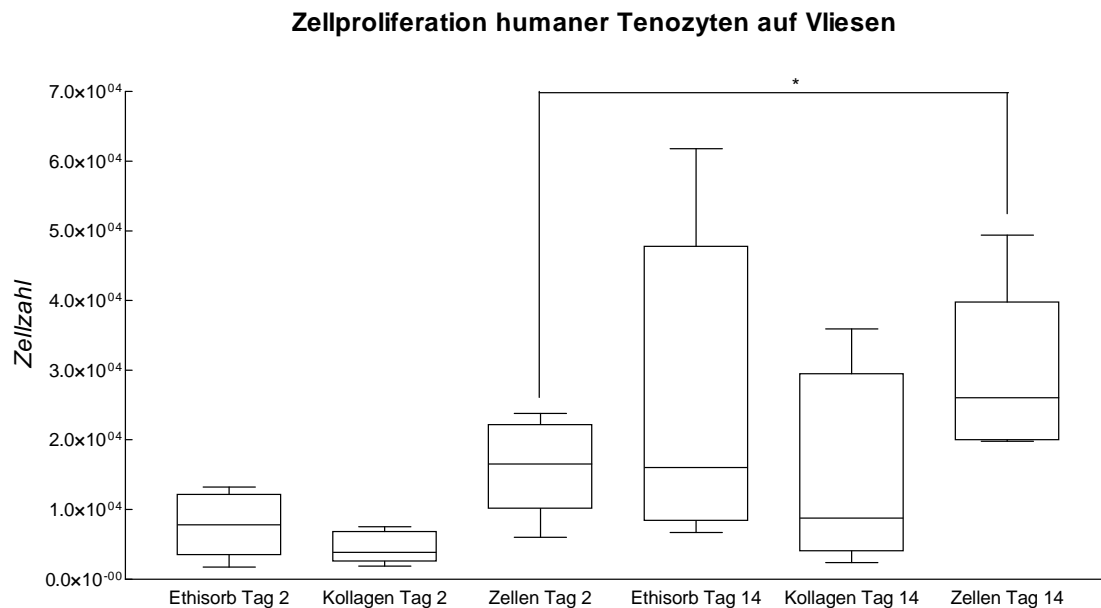


Abbildung 19: Proliferation von Tenozyten auf Vliesen im Verlauf. absolute Zellzahlen auf Kollagenmatrixvliesen (Shoulder Patch) und PGA/PDS Vliesen nach 2 und 14 Tagen Kultivierungszeit. Zellkultivierung ohne Vliese diente als Kontrolle. Die gemessenen Extinktionswerte wurden mit Hilfe einer Standardkurve in absolute Zellzahlen zurücktransformiert. (n=6). * $p < 0,05$ (Wilcoxon paired Test)

Nach zwei Tagen Kultivierungszeit zeigte sich, dass auf beiden Vliesen weniger vitale Zellen vorhanden waren (Ethisorb: $7,85 \times 10^4 \pm 4,12 \times 10^4$; Shoulder Patch: $4,43 \times 10^4 \pm 2,07 \times 10^4$) als in den Kontrollen ohne Vliese (Zellen: $16,32 \times 10^4 \pm 6,08 \times 10^4$) (s. Abb.19).

Nach 14 Tagen konnte sowohl auf beiden Vliesen (Ethisorb: $2,41 \times 10^5 \pm 2,07 \times 10^5$; Shoulder Patch: $1,41 \times 10^5 \pm 1,29 \times 10^5$), als auch in den Kulturen ohne Vliese (Zellen: $2,86 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^5$) eine höhere absolute Zellzahl als Tag 2 beobachtet werden. Auch nach 14 Tagen waren tendenziell mehr Zellen auf den PGA/PDS Vliesen (Ethisorb) nachweisbar als auf den Kollagenmatrixvliesen (s. Abb. 19).

Aufgrund großer Schwankungen in den gemessenen Zellzahlen nach 14 Tagen in den Gruppen der zellbesiedelten Vliese, konnte kein signifikanter Unterschied in den absoluten Zellzahlen an beiden Auswertungstagen, sondern nur in der Kontrollgruppe ohne Kultivierung auf Vliesen festgestellt werden ($p < 0,05$). Jedoch zeigte sich eine tendenziell höhere Proliferationsrate auf den Ethisorb Vliesen ($p = 0,09$) zwischen Tag 2 und 14 im Vergleich zu den Shoulder Patch Vliesen ($p = 0,15$) (s. Abb. 19).

3.6 Histologien zellbesiedelter Vliese

Für die Darstellung der Verteilung der Tenozyten in den Vliesen wurden $0,5 \times 0,5$ cm große Vliese mit 3×10^5 Zellen besiedelt und Kryoschnitte dieser Proben nach 2 Tagen und 14 Tagen angefertigt. Es wurden horizontale Schnitte oberflächennaher Schichten sowie basaler Schichten durch die Vliese hergestellt. Dies war erforderlich, da somit zwischen

einer nur oberflächlichen Zelladhärenz und einer Penetration vitaler Zellen auch in tiefere Schichten der Vliese unterschieden werden konnte. Um einen Überblick über die Verteilung der Zellen in den Vliesen zu gewinnen wurden diese, nach einer Einbettung in 5%iger Succrose (s. 2.2.5.2 S.43), mit einer H.E.- Färbung gefärbt. Ein Vitalitätsnachweis der auf den Vliesen angesiedelten Tenozyten wurde in dieser Arbeit nicht geführt. Die Abbildungen 20 zeigen repräsentative Schnitte durch beide Vliesmaterialien nach einer Biesiedelungszeit von 2 Tagen. Die Abbildungen 21 verdeutlichen das Verteilungsmuster der Zellen nach einer Besiedelungszeit von 14 Tagen.

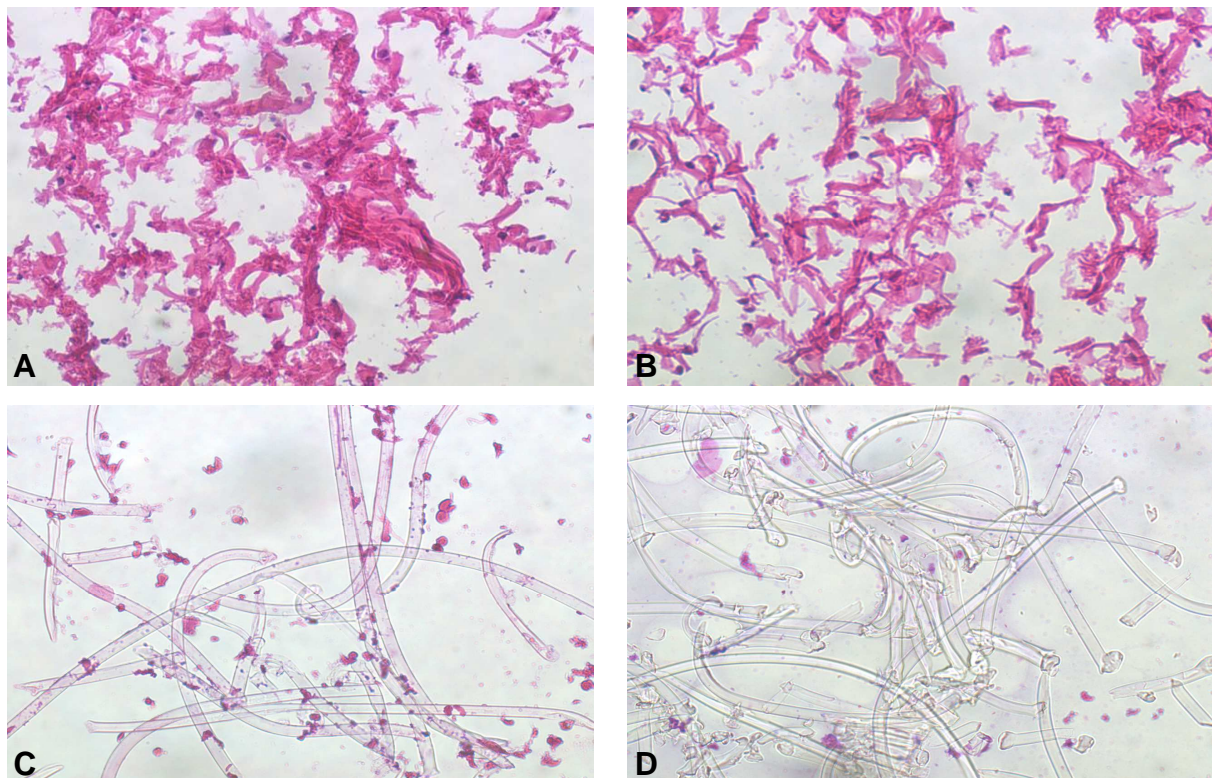


Abbildung 20: H.E.-Färbung von zellbesiedelten Vliesen nach 2 Tagen. H.E.-Färbung zum Vergleich von zellbesiedelten Kollagenvliesen (Shoulder Patch) und PGA/PDS Vliesen (Ethisorb). Die Kultivierungszeit der besiedelten Vliese betrug 2 Tage. Zellen waren sowohl auf PGA/PDS Vliesen als auch auf Kollagenvliesen entlang der Vliesfasern adhären. Repräsentative Aufnahmen. Vergrößerung 20x. A: oberflächliche Schicht Kollagenvlies. B: basale Schicht Kollagenvlies. C: oberflächliche Schicht PGA/PDS Vlies. D: basale Schicht PGA/PDS Vlies. (n=2)

Sowohl auf dem Kollagenvlies als auch auf dem PGA/PDS Vlies waren mehr Zellen in den oberflächlichen als in den basalen Schichten nachweisbar. Die Zellen adhärten überwiegend den Fasern der Vliese. Ein deutlicher Unterschied in der Zellzahl zwischen den verwendeten Vliesen konnte nicht festgestellt werden.

Sowohl auf dem Kollagenvlies als auch auf dem PGA/PDS Vlies konnte zu diesem Auswertungszeitpunkt eine höhere Zellzahl in oberflächlichen Vliesschichten festgestellt werden (s. Abb. 20).

Die Färbung der PGA/PDS Vliese gestaltete sich sehr schwierig, da sich die Fasern in der Alkoholreihe während des Färbeproganges teilweise auflösten. Dies schränkte die Beurteilbarkeit dieses Vliestyps ein. Dieser Effekt führte, insbesondere nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen, zu einer sehr schwierigen Auswertungssituation.

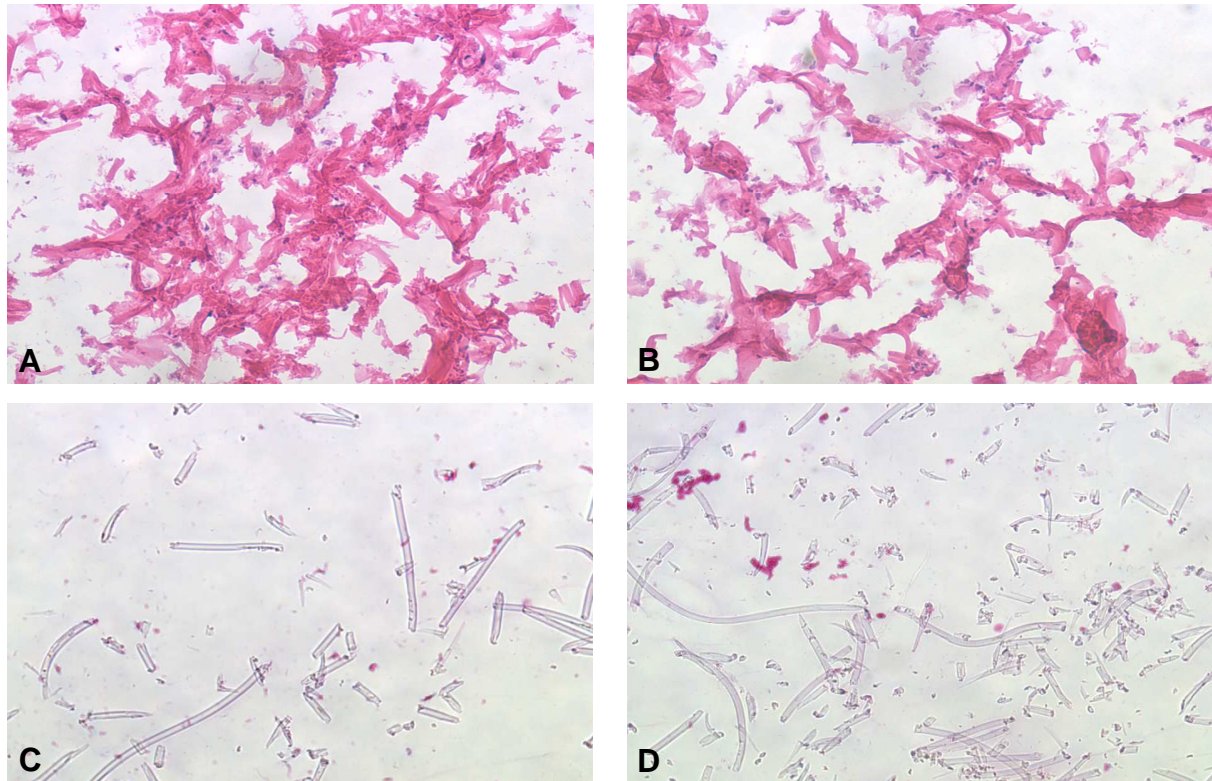


Abbildung 21: H.E-Färbung von zellbesiedelten Vliesen nach 14 Tagen. H.E Färbung zum Vergleich von zellbesiedelten Kollagenvliesen (Shoulder Patch) und PGA/PDS Vliesen (Ethisorb). Die Kultivierungszeit der besiedelten Vliese betrug 14 Tage. Repräsentative Aufnahmen. Zu sehen ist eine deutliche Faserdegradation der PGA/PDS Vliese (C und D). Vergrößerung der Kollagenvliese 20x. Vergrößerung der PGA/PDS Vliese 10x. A: oberflächliche Schicht Kollagenvlies. B: basale Schicht Kollagenvlies. C: oberflächliche Schicht PGA/PDS Vlies. D: basale Schicht PGA/PDS Vlies. (n=2)

Nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen konnte im Vergleich zu 2 Tagen keine höhere Zellzahl in den oberflächlichen Schichten beider Vliese festgestellt werden. Jedoch fanden sich in den basalen Schichten beider Vliese, insbesondere im Kollagenvlies, mehr Zellen zu diesem späteren Beobachtungszeitpunkt. Die Zellen waren immer noch an den Vliesfasern adhärent. Diese Aussage sowie Aussagen zur detektierbaren Zellzahl, konnten für die PGA/PDS Vliese nach 14 Tagen Kultivierungszeit aufgrund der schnelleren Faserdegeneration in den Alkoholreihen während des Färbeproganges nicht mehr getätigt werden.

3.7 maximale Fadenausreißkraft durch U-Naht Befestigung

Die biomechanischen Eigenschaften gegenüber Zugbelastungen sind für die klinische Anwendbarkeit der potentiellen Zellträgermaterialien sehr wichtig. Nach einer 56-

stündigen Vorinkubation in Zellkulturmedium, welche in Anlehnung an die klinische Situation gewählt wurde, erfolgte die Messung der maximalen Fadenausreißkraft unbesiedelter Vliese nach einer U-Naht Befestigung. Es zeigte sich, dass Kollagenvliese ($14,48 \text{ N} \pm 3,58 \text{ N}$) deutlich höhere Zugbelastungen tolerierten als PGA/PDS Vliese ($2,11 \text{ N} \pm 0,48 \text{ N}$) ($p < 0,01$) (s. Abb. 22). Alle Vliese rissen immer im Bereich der Einstichstelle der Fäden, der schwächsten Stelle dieser Konstrukte.

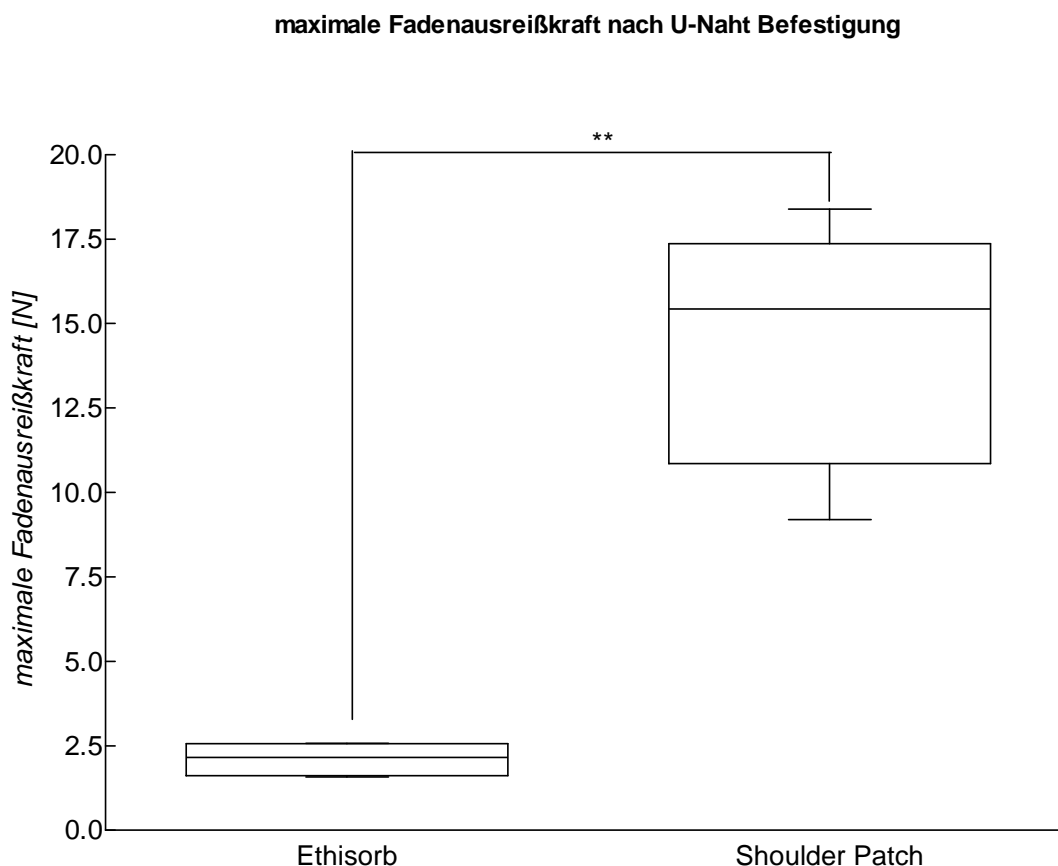


Abbildung 22: Fadenausreißkraft nach U-Naht Befestigung. Bestimmung der maximalen Fadenausreißkraft nach U-Naht Befestigung mit der Zwick Universaltestmaschine. Die Einstiche lagen mindestens 0,7 cm von der Kante entfernt. Die Stichbreite betrug 0,3 cm. (n=6). ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney Test)

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Zellisolation

Die Suche nach adäquatem autologem Donorgewebe und den passenden Zelltypus ist eine wesentliche Grundsatzfrage der *in-situ* Regeneration von Sehnengewebe. Tenozyten stellen neben mesenchymalen Stammzellen einen vielversprechenden Ansatz dar. Ihre Isolation aus dem Ausgangsgewebe ist jedoch schwierig.

Es existieren in degenerativ verändertem Sehnengewebe neben Tenozyten andere Zellen, deren fibrochondrales Expressionsmuster auf eine Metaplasie schließen lässt (141, 142). Eine Trennung dieser verschiedenen Zellarten während des Isolationsvorganges erscheint diffizil. Ebenfalls komplex ist die vollständige Separation umliegenden Bindegewebes von Sehnengewebe während der Gewebepräparation. Zwar zeigte sich, dass sich Zellen des Hüllgewebes einer Sehne in Proliferation und Seneszenz den Tenozyten ähnlich verhalten, jedoch nicht als identisch anzusehen sind (143). Diese Faktoren erschweren während des Zellisolationsvorganges deutlich die Gewinnung späterer reiner primärer Tenozytenkulturen.

Die ZAW als eine Möglichkeit der Zellisolation aus Geweben hat den wesentlichen Nachteil, dass vitale Tenozyten erst nach einer Kultivierungszeit von ca. 1-3 Wochen gewonnen werden können (116) und deren Anzahl zudem noch gering ist. Isolierungszeit und Zellmenge sind jedoch für den klinischen Einsatz entscheidende Parameter, auch wenn diese Methode für isolierte Zellen insgesamt schonender erscheint. Eine Möglichkeit, zukünftig die Zellausbeute durch diese Isolationsmethode zu erhöhen, könnte eine Optimierung der initial beschriebenen Methode sein, indem man die Sehnenstücke sofort in Zellkulturflaschen statt in Petri-Schalen platziert. Dies erlaubt zwar nur einen Auswanderungszyklus, führt aber, anders als bei sukzessiver ZAW in Petri-Schalen mit Umbettung der einzelnen Sehnenstücke, zu einer höheren initialen Zellausbeute aufgrund des größeren Platzangebotes. Außerdem könnte dieses Vorgehen zum Einsparen einer Zellpassagierung und zur Erzeugung von homogeneren Zellkulturen mit Zellen gleichen Alters führen.

Eine weitere Methode der Isolierung von Tenozyten aus Sehnengewebe ist die EGV nicht zellulärer Strukturen durch das Enzym Kollagenase I (0,2%). Für die klinische Bedeutung dieser Methode spricht die Möglichkeit, innerhalb kurzer Zeit vitale Zellen zu generieren. Jedoch können die Folgen des enzymatischen Einwirkens auf die Zellvitalität,

Zellproliferation, Zellmorphologie und Zelldifferenzierung bisher nur unzureichend abgeschätzt werden. Lui, P et al. konnten in einem *in vivo* Experiment zeigen, dass die Injektion von Kollagenase I in die Patellarsehne einer Ratte zu ektopen Ossifikationen und zur Ausbildung chondrogen differenzierter Zellen führte (120). Dies ist vereinbar mit der in unserer Studie gemachten Beobachtung, dass tendenziell eine erhöhte Rate an morphologisch veränderten Tenozyten in Zellkultur nach EGV gefunden wurde.

Bedenklich scheint auch, dass das Enzym Kollagenase bei systemischer Aufnahme zu einer inflammatorischen Immunantwort mit erhöhter Infektionsrate führt (144). Vor einer klinischen Anwendung dieses Verfahrens müssen daher noch umfangreiche Untersuchungen zur Unbedenklichkeit dieses Enzyms und seines Einflusses auf die Zellen durchgeführt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt die Verwendung dieses Isolationsverfahren wohl vorerst nur experimentellen Versuchsansätzen vorbehalten.

4.1.2 Zytotoxizitätsprüfung des Enzyms Kollagenase Typ I

Kollagenase Typ I ist ein Enzym, das zum Abbau wesentlicher Strukturkomponenten der EZM in Sehnengewebe führt. Es wurde in einem Tiermodell von Warden, S. J zur Untersuchung der Pathogenese degenerativer Sehnenerkrankungen verwendet (145). In der vorliegenden Arbeit wurde es zur Zellisolation aus natürlichem Sehnengewebe benutzt.

Um die Toxizität der Kollagenase I auf Zellen einschätzen zu können, der sie während der EGV ausgesetzt waren, wurden Fibroblasten einer frühen Zellpassage in Kollagenase I gegeben und die Zellvitalität zu zwei Zeitpunkten untersucht.

Fibroblasten wurden verwendet, da die humanen Tenozyten dieses Versuches bereits mit dem Enzym in Kontakt gekommen waren (EGV) bzw. nur in sehr begrenzter Anzahl vorhanden waren (ZAW). Fibroblasten besitzen zwar ähnliche Eigenschaften wie Tenozyten (127), weisen aber auch einige andere Eigenschaften, wie beispielsweise im Proliferationsverhalten, auf (146). Daher sind die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes somit nur bedingt auf Tenozyten übertragbar, eine Tendenz scheint jedoch ableitbar zu sein.

Es ist auch zu berücksichtigen, dass während der Gewebeverdauung zur Zellisolation Tenozyten innerhalb eines festen Gewebeverbandes liegen und somit geschützt vor der Toxizität einer enzymatischen Destruktion sind. Jedoch ist die Frage der Zelltoxizität um so wichtiger, als die aus der EZM im Rahmen der Verdauung herausgelösten Zellen direkt dem Enzym Kollagenase I ausgesetzt sind und genau diese Zellen später kultiviert und auf den Vliesen angesiedelt werden. Das Ausmaß des schützenden Effektes der Sehnenfaszikel ist zwar nur schwer abzuschätzen und konnte in diesem Versuchsaufbau

nicht rekonstruiert werden, jedoch ist die Wirkung des Enzyms auf die bereits herausgelösten Zellen die entscheidende Fragestellung dieses Versuchsabschnittes gewesen. In diesem Zusammenhang gilt es aber auch zu bedenken, dass aufgrund des Fehlens der Strukturen der EZM in diesem Versuchsaufbau eine geringere Anzahl an Bindungsstellen für das katalytische Zentrum des Enzyms zur Verfügung stand. Zur Sättigung würden somit vermehrt Bindungsstellen an zellulären Proteinen aufgesucht werden. Somit könnte das Ausmaß des zelltoxischen Effektes des Enzymes Kollagenase I in diesem Versuch wahrscheinlich zu hoch bestimmt worden sein.

4.1.3 Zellzahlbestimmung und Zellproliferationsanalyse auf Vliesen

Die photometrische Bestimmung der Zellvitalität ist ein etabliertes Verfahren in experimentellen Versuchsanordnungen (147). Kommt dieses Verfahren zur Zellzahlbestimmung und Proliferationsmessung im Überstand von zellbesiedelten Vliesen zur Anwendung, ergeben sich Besonderheiten bei der Durchführung, die bei der Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden müssen.

Durch eine 24stündige Vorinkubation der Vliese in Zellkulturmedium sollten die initialen Ernährungsbedingungen der adhärierenden Tenozyten verbessert werden. Allerdings nahmen die Kollagenvliese aufgrund ihrer schwammartigen Konstruktion mehr Zellkulturmedium auf als die PGA/PDS Vliese. Beim Umsetzen der Vliese in 96-Well Platten wurde ein Teil dieses aufgesogenen Kulturmediums als Überstand sichtbar. Dieser Überstand wurde vor der Zellbesiedelung abpipettiert, um die Volumina der Überstände auf den Vliesen zu minimieren, da mögliche Volumenunterschiede zu einem Verdünnungseffekt des Formazans hätten führen können und so einen geringeren Extraktionswert bzw. eine geringere Zellzahl vorgetäuscht hätten.

Die histologische Auswertung zeigte, dass die Tenozyten nicht nur in oberflächennahen, sondern auch in basalen Schichten beider Vliese vorhanden waren und an den Vliesfasern adhärten. Wie diese Zellen anteilmäßig während des Auswertungsvorganges an der mitochondrialen Umsetzung des Tetrazoliumsalzes teilnehmen konnten, blieb ungeklärt. So könnte aufgrund fehlender Teilnahme am Umsetzungsvorgang von Zellen in basalen Schichten trotz einer hohen tatsächlichen absoluten Zellzahl, der gemessene optische Dichte Wert tendenziell zu niedrig bestimmt worden sein. Dieser Effekt hätte möglicherweise aufgrund des Dickeunterschiedes der Vliese (Kollagenvlies ca. 3,5 mm - PGA/PDS Vlies ca.1 mm) einen deutliche höheren Einfluß bei Versuchsreihen mit Kollagenvliesen gehabt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 höhere Zellausbeute aus degenerativem Sehnengewebe

Es zeigte sich, dass durch die EGV mehr Zellen in kürzerer Zeit generiert werden können, als durch die ZAW. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass bei der Gewebeverdauung aus Proben älterer Spender (Kreuzband und Bizepssehne) mehr Zellen isoliert werden konnten als aus der Sehne des M. Semitendinosus, die von jüngeren Spendern stammte. Im Gegensatz hierzu konnte diese Beobachtung bei Anwendung der ZAW nicht getätigt werden.

Untersuchungen an degenerativ veränderten Sehnen haben gezeigt, dass diese, typische Veränderungen aufweisen, unter anderem eine Modifikation der Kollagenmatrixstruktur. Birch, H.L. et al. konnte zeigen, dass viel beanspruchtes Sehnengewebe einen geringeren Umsatz an Kollagen Typ I und III zeigt, so dass die Kollagenfibrillen bis zu ihrem Abbau längere Zeit in der EZM verbringen (148). Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe in degenerativem Sehnengewebe des Pferdes einen verringerten Durchmesser der Kollagenfibrillen sowie einen höheren Gehalt an Kollagen Typ III bei gleichem Gesamtkollagengehalt feststellen (149). Diese Veränderungen der Kollagenmatrix in degenerativem Sehnengewebe könnten möglicherweise einen besseren Schutz der Tenozyten vor der enzymatischen Zelloxizität bedingen und somit die höhere Zellausbeute aus diesen Sehnen erklären.

Einen anderen Erklärungsansatz liefert möglicherweise die Beobachtung von Lui, P. et al., der ektopische Ossifikationen in einem Kollagenase-induzierten Sehnendegenerationsmodell fand (120). Diese Ossifikationen könnten, ähnlich der modifizierten Kollagenmatrix in degenerativem Sehnengewebe, einen höheren Schutz zellulärer Sehnenbestandteile vor enzymatischer Zersetzung darstellen. Allerdings erscheint die Entstehung solcher Ossifikationen während eines Zeitraumes von ca. 17 h schwer möglich, so dass diese Vermutung sehr fraglich zu sein scheint.

Eine weiteres Erklärungsmodell für diese Beobachtung könnte eine Zunahme der Vernetzung von Kollagenfibrillen durch die „cross links“ sein. Diese nehmen mit steigendem Alter an Anzahl zu. Cross links sind trivalente intermolekulare Verbindungen aus (Hydroxylysil Pyridinolin (HP) und Lysyl Pyridinolin (LP). Sie werden durch enzymatische Aktivität zwischen den fibrillären Strukturen des Kollagens gebildet, stabilisieren diese und verleihen der Sehne somit eine höhere mechanische Stabilität. Kollagen-Umbauprozesse verlangsamen sich mit zunehmendem Alter, so dass ein vermehrtes Vorkommen solcher cross-links resultiert. Zusätzlich sorgt eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen den Kollagenfibrillen dafür, dass die Anzahl der cross-

links im Alter steigt (150). Außerdem kann eine Anhäufung von „advanced glycation end products“ im Sehngewebe für die Zunahme der Steifigkeit von Sehnen in höherem Alter mitverantwortlich gemacht werden (151). Die altersbedingte stärkere interfibrilläre Vernetzung des Kollagenverbands könnte einen Schutz der Zellen während der enzymatischen Verdauung darstellen und somit die höhere Zellausbeute aus Proben älterer Spender erklären.

Eine weitere typische Veränderung in degenerativen Sehnen- und Bandgewebe ist die deutlich höhere Zelldichte im Vergleich zu jungem Gewebe (152, 153). Dieses Phänomen könnte ebenfalls die höhere Zellausbeute aus Sehngewebe älterer Spender durch die EGV bedingen.

Allerdings lässt sich die Zunahme der Zelldichte in degenerativ verändertem Gewebe nicht ausschließlich auf eine Zunahme der Tenozytenanzahl zurückzuführen. So konnte Glazebrook, M. A. et al. in viel belasteten Sehnen der Ratte, bedingt durch Vaskularisierung, vermehrt endotheliale Zellen sowie Fibroblasten finden (154). Es bedarf der Klärung, ob eine höhere primäre Zellausbeute aus degenerativ verändertem Sehngewebe durch die EGV zugleich das Vorhandensein von tenozytenfremden Zellen, wie endothelialen Zellen, bedeutet. Diese Hypothese konnte jedoch durch die molekularbiologische Genexpressionsanalysen dieser Arbeit, die im Folgenden diskutiert werden, nicht gestützt werden.

4.2.2 Unterschiede in der Expression von Kollagen Typ I und Decorin in primären Tenozytenkulturen

Die Tenozytenkulturen der dritten Zellpassage wurden auf ihr Expressionsmuster wichtiger Strukturgene des Sehngewebes untersucht.

Es zeigte sich in allen Tenozytenkulturen, unabhängig von der Isolationsmethode sowie in allen Kontrollgeweben eine durchgängige Expression an Kollagen Typ I und Decorin. Es ist bekannt, dass diese Proteine in Sehngewebe, jedoch auch in Knochen- und Knorpelgewebe exprimiert werden (155-157). Sowohl ein verminderter Gehalt an Decorin wie auch an Kollagen Typ I in der EZM von Sehngewebe führte in biomechanischen Untersuchungen von Zhang, G et al. und Chokalingam, K. et al. zu einer Reduktion der linearen Festigkeit des Gewebes (158, 159). Da diese Proteine somit wesentlich für diese wichtige Eigenschaft von Sehngewebe sind, wurden die qualitativen Ergebnisse der RT-PCR durch eine quantitative Messung des mRNA Gehaltes genauer untersucht.

Tenozyten, die durch EGV isoliert worden waren, besaßen in der dritten Zellpassage eine höhere Expression an Kollagen Typ I verglichen mit der ZAW, auch wenn dieser Unterschied nur in Kulturen von Spendern einer Bizepssehne zu einem signifikanten

Unterschied führte. In Arbeiten von Chen, C. H. et al. und Bosch, G. et al. wurde gezeigt, dass äußere Einflussnahmen, wie Laser Bestrahlung und extrakorporale Schockwellen Applikation eine Regulation, wenn auch gegenläufig, der Kollagen I Expression in kultivierten Tenozyten bedingen (160, 161). Es ist daher möglich, dass durch den Kontakt während des Isolationsvorganges von Tenozyten mit dem Enzym Kollagenase I, das eine inflammatorische Noxe darstellt, es zu einer up-Regulation der Kollagen I Expression kam. Die Richtigkeit dieser Annahme wird wahrscheinlicher durch die Untersuchung von Xue, M. et al., der eine deutliche Zunahme der Kollagen Typ I Synthese in Tenozytenkulturen, die aktiviertem Protein C ausgesetzt wurden, zeigte (162). Dieses Vitamin-K abhängige antikoagulatorische Protein wird durch Thrombin in aktiviertes Protein C verwandelt und inaktiviert zusammen mit Protein S und Phospholipiden die aktivierten Faktoren V und VIII (163). Aktiviertes Protein C hat einen antiinflammatorischen Effekt, indem es neben der Inhibition der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auch die NO Synthese inhibiert und ist in postinflammatorischen Zuständen vermehrt nachweisbar (164). Kollagenase I stellte während des Isolationsvorganges eine inflammatorische Noxe dar, so dass sich spätere *in vitro* Tenozytenkulturen in einem postinflammatorischen Zustand befunden haben könnten. Es ist davon auszugehen, dass in einem postinflammatorischen Zustand, neben Protein C auch tenozyteneigene postinflammatorische Proteine synthetisiert werden. Nehmen diese Proteine ebenfalls Einfluss auf die Kollagensynthese der Tenozyten, so könnte die Beobachtung einer vermehrten Kollagensynthese in Tenozytenkulturen auch in einem postinflammatorisch Zustand nach EGV möglicherweise erklärt werden. Allerdings ist dies rein hypothetisch und erfordert in zukünftigen Untersuchungen die Identifikation solcher Proteine, die bislang nicht erfolgte.

Allerdings scheint auch die Zellmorphologie Einfluss auf die Kollagenexpression zu nehmen. So konnten Li, F. et al. eine Korrelation zwischen einer elongierten Zellmorphologie und einer erhöhten Kollagen Typ I Expression nachweisen (165). Ähnliches konnte durch Thampatty et al. gezeigt werden, der in Tenozyten, die auf einer speziellen Membran gezüchtet wurden und die Zellen in eine elongierte Form zwang, auch noch in der vierten Zellpassage eine tenozytenspezifisch hohe Tenomodulin und Kollagen I Expression nachweisen konnte (166). Wurden morphologisch und phänotypisch „dedifferenzierte“ Tenozyten, die auf einem normalen Boden kultiviert worden waren, im weiteren Verlauf des Experiments ebenfalls auf der speziellen Membran kultiviert und in eine elongierte Zellform gezwungen, stiegen sowohl die Tenomodulin- als auch die Kollagen I Expression wieder an (167). Diese Arbeit zeigt, dass der Verlust der typischen Zellmorphologie nicht ausschließlich eine passive Folge des veränderten Expressionsverhaltens der Zelle ist, sondern selbst aktiven Einfluss auf das Expressionsverhalten zu haben scheint (168).

Diese Ergebnisse scheinen jedoch widersprüchlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da wir tendenziell einen höheren Anteil abgerundeter, wenig elongierter Zellen in Kulturen nach EGV beobachteten. In genau diesen Kulturen war jedoch die Kollagen Typ I Expression aller drei Versuchsgruppen höher als in Kulturen nach Isolation durch ZAW. Möglicherweise kam es zu einer Überlagerung der inflammatorischen bzw. postinflammatorischen (s. oben) vermehrten Kollagen Typ I Synthese durch die enzymatische Verdauung, die den Verlust des Phänotyps, mit konsekutiver Reduktion der Kollagen Typ I Produktion in Kultur überwog.

In den Zellkulturen aus der langen Bizepssehne und des vorderen Kreuzbandes zeigte sich eine höhere Expression an Decorin, wenn diese durch ZAW gewonnen wurden. In Untersuchungen von Karousou, E. et al. und Corps, A. N. et al. konnten festgestellt werden, dass in rupturierten Sehnen, nicht aber in degenerativ veränderten Sehnen, eine gesteigerte Decorinexpression vorhanden ist (169, 170). Diese Daten wurden in einer Untersuchung von Yokota et al. für die rupturierte Supraspianthussehne bestätigt (171). Er zeigte, dass der Decoringehalt noch lange Zeit nach Ruptur der Sehne auf einem erhöhten Niveau verbleibt. Während des Zellisolierungsvorganges durch ZAW wurde durch Zerschneiden des Sehnengewebes in ca. 1 cm große Stücke eine künstliche Sehnenruptur erzeugt. Durch anschließende Kultivierung in Zellkulturmedium konnten daraus resultierende genetische Regulationsvorgänge stattfinden, die möglicherweise zu einer erhöhten Decorinexpression geführt haben könnten. Im Gegensatz dazu konnten diese Genregulationsvorgänge aufgrund der sofortigen Platzierung der Sehnenstücke in Enzymlösung und daraus resultierender veränderter Umgebungsbedingungen nicht in der Gruppe der EGV nachgewiesen werden.

Hinweise, warum dieser Effekt jedoch in Proben jüngerer Spender einer Semitendinosussehne nicht zu beobachten war bzw. hier sogar eine tendenziell höhere Expression an Decorin in Kulturen, die durch EGV gewonnen wurden, zu sehen war, konnte im Rahmen dieser Arbeiten nicht gefunden werden. Dies könnte eine Fragestellung künftiger Untersuchungen sein.

Es muss berücksichtigt werden, dass die Spender vorderer Kreuzbänder und der langen Bizepssehnen aufgrund degenerativer Gelenkerkrankungen der Knie- und Schultergelenke, häufig präoperativ mit Corticoidinjektionen behandelt worden waren. Chen, C. H et al zeigten, dass Corticoide zu einer geringeren Expression von Kollagen Typ I und Decorin führen (172). Kulturen von Spendern einer Bizepssehne oder eines vorderen Kreuzbandes exprimierten jedoch nicht weniger Kollagen Typ I und Decorin als Kulturen von jungen Spendern einer Semitendinosussehne. Somit konnten diese Ergebnisse nicht durch Beobachtungen dieser Arbeit verifiziert werden. Möglicherweise spielt auch der dauerhafte inflammatorische Zustand der arthrotischen Gelenke bei der

Expression der untersuchten Gene eine Rolle. Da hierzu allerdings keine histologischen Ergebnisse vorlagen, kann darüber keine Aussage getroffen werden.

Im Folgenden soll auf qualitative Unterschiede in der Genexpression wichtiger Proteine in Sehngewebe eingegangen werden.

4.2.3 Expressionsmuster und Dedifferenzierungspotential primärer Tenozytenkulturen

Alle Zellkulturen der dritten Zellpassage zeigten durchgängig eine schwache Expression von Kollagen Typ III, was mit einem tenogenen Expressionsprofil vereinbar ist. Wie von Maeda, E. et al. gezeigt werden konnte, bedingen Zugbelastungen Regulationsvorgänge der Kollagen Typ III Expression, jedoch existiert auch eine basale Expression in nicht belasteten Sehngewebe (173).

Weiterhin fand sich auch eine durchgängige Expression von Tenascin-C in allen Versuchs-, wie auch in allen Kontrollgruppen. Mechanische Belastungen konnten in frühen Untersuchungen von Chiquet-Ehrismann, R et al. und Eliasson, P. et al. ihren Einfluss auf die Regulation der Expression dieses Proteins der EZM nachweisen (174, 175). Da alle Sehnen der Versuchsgruppen *in vivo* Zugbelastungen ausgesetzt sind, war eine Tenascin-C Expression in den primären Tenozytenkulturen zu erwarten und mit einem tenogenen Expressionsprofil vereinbar. Allerdings schien die Tenascin-C Expression, verglichen mit dem Expressionsniveau anderer Strukturproteine, stark ausgeprägt zu sein. In der Arbeit von Taylor, S. E. et al. wurde ein niedriges Expressionsniveau von Tenascin-C mit einem tenogenen Expressionsmuster assoziiert (176), was für eine Dedifferenzierung der untersuchten Tenozytenkulturen in dieser Arbeit spräche und in Übereinstimmung mit den zellmorphologischen Ergebnissen und anderen Expressionsmustern von Strukturproteinen steht. Übereinstimmend hierzu beobachteten Fischer et al., dass eine hohe Tenascin-C Expression durch Blockade der Syndecan-4 Bindungsstellen mit Fibronektin zu einer veränderten Zellmorphologie führt (31). In dieser Arbeit konnte tendenziell eine höhere Anzahl morphologisch dedifferenzierter Zellen in Kulturen, die durch EGV gewonnen wurden, festgestellt werden. In künftigen Untersuchungen sollte durch eine quantitative vergleichende Messung untersucht werden, ob eine Veränderung der Zellmorphologie wirklich mit einer erhöhten Teascin-C Expression einhergeht. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Trylovich, D. J. et al. bereits zeigen konnte, dass Zellen mit einer spindelförmigen Morphologie eine bessere initiale Adhärenz an artifiziellen Oberflächen aufweisen als Zellen mit abgerundeter Morphologie (177), was für die Effektivität späterer Besiedelungsverfahren auf artifiziellen Oberflächen wie Kollagen oder PGA/PDS von hoher Relevanz ist.

Fibronectin wurde ebenfalls in allen analysierten Tenozytenkulturen sowie in allen Kontrollgeweben exprimiert. Riley G. konnte darstellen, dass es ähnlich wie Tenascin-C in chronisch degenerativ verändertem Sehnengewebe vermehrt synthetisiert wird (178), was seine Expression in Zellkulturen der Bizepssehne und des vorderen Kreuzbandes von älteren Spendern erklärt. Es existieren aber auch Arbeiten, wie von Asundi, K. R. et al., die eine basale Expression in gesundem Sehnengewebe wie der Semitendinosussehne nachweisen konnten (179).

Die Expression von Tenascin-C und Fibronectin konnte jedoch auch in Knochen- und Knorpelgewebe nachgewiesen werden (180, 181). Somit kann die Expression dieser Proteine in primären Tenozytenkulturen nur schwacher Hinweis für eine tenogenen Differenzierung sein, jedoch nicht als beweisend angesehen werden. Auch hier sollte in Folgeversuchen mittels einer quantitativen Analyse der Fibronectingehalt in den verschiedenen Spendergeweben analysiert werden.

Tenomodulin ist ein Transmembranprotein, das einer positiven Regulation des Transkriptionsfaktors Scleraxis unterliegt und wie von Shukunami, C. et al. beschrieben, sehr spezifisch in Sehnengewebe exprimiert wird (41). Aufgrund zu geringer Zellzahlen konnte eine Expressionsanalyse von Tenomodulin in der ersten Zellpassage direkt nach Zellisolation nicht durchgeführt werden. In der dritten Zellpassage nach Isolation konnte in dieser Arbeit, bis auf eine Ausnahme, die Tenomodulinexpression nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für einen schnellen Verlust des tenogenen Expressionsmusters in *in vitro* Zellkulturen, was Yao, L. et al bereits belegen konnte (119).

Auch Zhu et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass Tenozyten, die in zweidimensionaler *in vitro* Kultur gezüchtet wurden, ihre elongierte Zellform und gleichzeitig auch ihr spezifisches tenogenes Expressionsmuster verloren, was an einer sinkenden Expression von Tenomodulin und Kollagen I mit zunehmender Zellpassage zu beobachten war (167). Der fehlende Nachweis einer Tenomodulinexpression in fast allen Kulturen dieser Arbeit stützt diese Beobachtungen und bestärkt die Notwendigkeit, nach verbesserten *in vitro* Kultivierungsbedingungen zu suchen, die einen ausreichenden Zeitraum zur Vermehrung von Tenozyten für die Besiedelung von Vliesen ermöglichen ohne jedoch das Expressionsmuster zu beeinflussen.

In den Kontrollgeweben konnte sowohl in Chondrozyten- als auch in Osteozytenkulturen eine sehr schwache Expression von Tenomodulin nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit neuen Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Jelinsky, S. A. et al und Watahiki, J. et al., die zeigten, dass Tenomodulin dominant in Sehnengewebe, jedoch auch in sehr geringem Maße in anderen Gewebearten gefunden werden kann (182, 183). Scleraxis ist ein Transkriptionsfaktor, der in der aktuellen Literatur wie bei Kuo, C. K. and Tuan, R. S. ebenfalls als „Markerprotein“ einer tenogenen Differenzierung dient (184). In

dieser Arbeit konnte die Expression, bis auf eine Ausnahme, durchgängig in allen Tenozytenkulturen der dritten Zellpassage nachgewiesen werden. Dieses Expressionsverhalten spricht wiederum gegen eine frühzeitige Dedifferenzierung von Tenozyten in zweidimensionalen *in vitro* Zellkulturen. Allerdings konnte das Vorhandensein einer Expression dieses Transkriptionsfaktors auch in Geweben wie Knorpel und Knochen gezeigt werden (176). Daher erscheint der alleinige Nachweis einer Scleraxisexpression in Zellkulturen nicht eindeutig für ein tenogenes Expressionsmuster zu sprechen und muss als weniger spezifisch als eine Tenomodulinexpression beurteilt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Daten dieser Arbeit die Annahme einer raschen Dedifferenzierung von Tenozyten nach Zellisolation in einer zweidimensionalen *in vitro* Zellkultur stärken.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass in allen Zellkulturen eine Aggrecanexpression, einem Protein der EZM in Knorpelgewebe, nachzuweisen war. Die Arbeitsgruppe von de Mos M. et al. konnten bereits das chondrogene Dedifferenzierungspotenzial von isolierten Tenozyten nachweisen (185). Außerdem befinden sich Chondrozyten physiologischerweise in der Übergangszone von der Sehne zum Knochen (186), was diese Expression in den Zellkulturen teilweise erklären kann. Aufgrund der nicht durchgeführten RT-PCR für Aggrecan aus Zellkulturen direkt nach der Zellisolation kann nicht eindeutig abgeschätzt werden, ob eine chondrogene Dedifferenzierung der *in vitro* Kulturen oder eine primäre Isolation chondrozytenähnlicher Zellen für die starke Aggrecanexpression in den Tenozytenkulturen verantwortlich war.

In einigen Zellkulturen konnte auch ein Expression des dominant in Knochengewebe vorhandenen Proteins Osteopontin nachgewiesen werden. Bekannt ist, dass ektope Ossifikationen in degenerativ veränderten Sehnen vorhanden sind (120), obgleich sich bei der Präparation der Sehnen kein makroskopischer Anhalt für das Vorliegen einer solchen heterotopen Ossifikation ergab. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte wiederum eine Dedifferenzierung der Tenozyten in der *in vitro* Kultivierung sein, wenngleich eine solche Dedifferenzierung bis heute in publizierten Arbeiten nicht gezeigt werden konnte. In zukünftigen Arbeiten sollte durch eine Analyse des Expressionsmusters primärer Tenozytenkulturen direkt nach Isolation und im weiteren Verlauf der *in vitro* Kultivierung das Dedifferenzierungspotential abgeschätzt und die Reinheit der Kulturen nach Isolation abgeklärt werden.

Es soll nun genauer auf Zelladhärenz und Proliferationsverhalten von Tenozyten auf Vliesen eingegangen werden.

4.2.4 Initiale Zelladhärenz und -proliferation auf zellbesiedelten Vliesen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die initiale Zelladhärenz und Zellproliferation von Tenozytenkulturen auf den kommerziell erhältlichen Vliesen Ethisorb (synthetisch) und Shoulder Patch (biologisch) zu analysieren. Sowohl zwei wie auch 14 Tage nach Zellbesiedlung konnten vitale Zellen auf beiden Vliesen nachgewiesen werden.

Ethisorb, ein resorbierbarer PGA/PDS Vlies, bietet Zellen eine gute Adhärenz, wie in den Arbeiten von Schmitt, S. C. et al. und Wunsch, L. et al. gezeigt wurde (140, 187). Dies widerspricht aber anderen Arbeiten, die polymeren Geweben eine schlechte Zelladhärenz zusprechen (188).

Die Arbeitsgruppe von Skodacek, D. et al. fand, dass der PDS Anteil des Ethisorb Vlieses hauptsächlich für die Zellvitalität auch nach Implantation verantwortlich zu sein scheint (189). Unsere Daten stärken diese Beobachtungen von Skodacek et al., insbesondere im Vergleich des PGA/PDS Vlieses zu dem Shoulder Patch Vlies auf Kollagenbasis. Es fanden sich nach zwei wie auch nach 14 Tagen tendenziell mehr vitale Zellen auf dem PGA/PDS Vlies, als auf dem Kollagenvlies. Einschränkend muss festgehalten werden, dass verglichen mit der Kontrollgruppe (Zellen ohne Vliese) auch auf dem PGA/PDS Vlies eine deutlich geringe Überlebensrate nach Besiedelung gefunden wurde. Dies spricht für eine eingeschränkte Biokompatibilität auch der synthetischen Materialien. Diese Beobachtung könnte aber auch Folge eines unzureichenden Besiedelungsverfahrens der Zellen auf dem Vlies sein. Eine wichtige Zielsetzung zukünftiger Arbeiten muss daher die Verbesserung der Effektivität der Besiedelungsverfahren sein, um eine höhere Zellvitalität nach Besiedelung zu erreichen.

Nicht nur die initial gute Zelladhärenz sondern auch eine gute Zellproliferation auf Ethisorb Vliesen wurde von Schmitt, S. C. et al. beschrieben (140). Eine Zellproliferation auf dem Ethisorb Vlies wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, sie war jedoch ebenfalls geringer als in Kontrollen (Zellen ohne Vlies). Dies lässt auf eine Inhibition der Proliferation auf artifiziellen Oberflächen wie den PGA/PDS Fasern gegenüber dem regulären Proliferationsverhalten schließen.

Nach Abschluß der jeweiligen Technik der initialen Besiedelung der Vliese, verteilen sich die Zellen durch Migration und Proliferation in den Zellträgern. In einer Arbeit von Hillmann, G. et al. zeigten zellbesiedelte Ethisorb Tamponaden nach einer Besiedelungszeit von zehn Tagen adhärente Zellen an Vliesfasern sowie eine homogene Verteilung der Zellen in den Tamponaden (190). Diese Daten konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit nach einer Besiedelungszeit von zwei Tagen bestätigt werden. Die Tenozyten adhärten an den Vliesfasern und wiesen eine homogene Verteilung in

den Vliesen auf. Auf Grund der zunehmenden Faserdegradation konnte 14 Tage nach der Zellbesiedelung hierüber keine valide Aussage mehr getätigt werden.

Ein immer wieder diskutiertes relevantes Anwendungsproblem für den klinischen Einsatz aller Polyestervliese ist die mögliche inflammatorische Immunantwort durch Zerfallsprodukte nach Implantation, die in einem Tiermodell von Safdar, A. et al. beschrieben wurden (191). Jedoch erfreuen sich synthetische Polymere in vielen Bereichen der Medizin als Implantatmaterialien großer Beliebtheit ohne zu relevanten Problemen zu führen.

Die Daten dieser Arbeit, die eine tendenziell bessere Zellproliferation auf dem synthetisch hergestelltem Ethisorb Vlies sahen, bedürfen einer kritischen Überprüfung, sind jedoch ermutigend, da die Verwendung von synthetischen Vliesmaterialien große technische Vorteile, gerade im Hinblick auf die Primärstabilität des Scaffolds, mit sich bringt.

Die Beobachtungen von Unsal, B. et al. widersprechen jedoch den Ergebnissen dieser Arbeit, da Unsal einen Vorteil in Zelladhärenz und Proliferationsverhalten auf Vliesen mit Kollagenmatrix als Grundstruktur fand (192). Dies bestätigen unsere Ergebnisse nicht, da sowohl nach zwei wie auch nach 14 Tagen weniger Zellen auf Proben der Kollagenvliese (Shoulder Patch) nachgewiesen wurden als auf den Proben von Ethisorb Vliesen. Takata, T. et al und Marinucci, L. et al. zeigten, dass Zellen die auf Kollagenschwämmen angesiedelt wurden, erst nach 1,5 h adhärten und erst nach 24 h zu proliferieren begannen, um anschließend ein gutes Proliferationsverhalten aufzuweisen (193, 194). Dies könnte möglicherweise die in dieser Arbeit gefundene geringere Zellzahl nach 48-stündiger Besiedelungszeit auf den Kollagenvliesen erklären, nicht jedoch nach zweiwöchiger Besiedelungszeit.

Einen möglichen Erklärungsansatz, die geringere Zellzahl nach zweiwöchiger Besiedelungszeit zu erklären, liefert Beier, J. P. et al. in seiner Arbeit, der zwar eine Proliferation von vitalen Zellen auf Kollagenvliesen nach 14-tägiger Besiedelungszeit zeigen konnte, jedoch auch eine vermehrte Apoptoserate in Kollagenschwämmen detektierte. Die Arbeitsgruppe führte als möglichen Grund eine zu hohe Dichte der Kollagenfasern in Schwämmen an, die eine Proliferation hemmen und schließlich zu vermehrter Apoptose führen könnte (195).

Desweiteren ist die Zellproliferation auf Kollagenmatrizes abhängig von der Besiedelungszellzahl und der Festigkeit des Ausgangsmaterials, wie Hadjipanayi, E. et al. zeigte (196). Die Einflüsse dieser beiden Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht und bieten somit eine mögliche Erklärung für die geringere Proliferation auf Kollagenschwämmen verglichen mit PGA/PDS Vliesen. Es konnte aber von Matsumura, Y. et al. gezeigt werden, dass sich eine zu hoch gewählte Besiedelungszellzahl auf Kollagenmatrixzellträgern negativ auf die spätere Zellvitalität

auswirken kann (197). Daher sind weitere Untersuchungen zur Optimierung der Besiedelungszellzahl und der Beschaffenheit der Kollagenschwämme und ihrer Porosität für einen klinischen Einsatz zur Sehnenregeneration dringend notwendig.

Einschränkend muss gesagt werden, dass die meisten publizierten Untersuchungen nicht mit primären humanen Tenozyten, sondern vorrangig mit Fibroblasten und Osteoblasten durchgeführt wurden, da das TTE erst in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des Interesses getreten ist. Deshalb können die Ergebnisse der zitierten Studien nur bedingt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklären. Insbesondere auch deshalb, da festgestellt werden konnte, dass die Zellarten durchaus einen wichtigen Einfluss auf das Besiedelungsverhalten hat (198).

Neben der Biokompatibilität sind für den klinischen Einsatz von Vliesen die Materialeigenschaften wichtige Parameter, um einerseits das operative „handling“ zu verbessern und andererseits eine akzeptable postoperative Stabilität zu erzielen. Daher wurde in dieser Arbeit die Reißfestigkeit der beiden Vliesmaterialien untersucht.

4.3.4 Untersuchungen der Fadenausreißkräfte

Für den klinischen Einsatz von Vliesen zur Defektdeckung größerer RMR ist die postoperative Stabilität, insbesondere gegenüber Zugbelastungen, ein entscheidender Parameter. Hierbei ist nicht nur die Zugbelastung des Vlieses wichtig, sondern die Festigkeit der eingebrachten Nähte, die das Vlies an der nativen Sehne befestigen.

Wünsch, L. et al zeigten, dass Ethisorb Vliese nach siebentägiger Besiedelungszeit durchschnittlich einer Zugbelastung von 22,54 N standhielten (187). Nach dieser kurzen Kultivierungszeit nach Zellbesiedelung ist von keiner wesentlichen Änderung der biomechanischen Eigenschaften, durch die von den Zellen produzierte EZM, auszugehen. Die basale Verstärkungsmembran des kollagenen Shoulder Patch Vlieses tolerierte durchschnittlich Zugbelastungen von 181,81 N (Daten wurden von der Firma TETEC, Reutlingen, Germany zur Verfügung gestellt). Hierbei handelte es sich aber um Messungen, bei denen keine Vorinkubation der Membranen in Zellkulturmedium stattgefunden hatte.

Da die Durchstechungsstellen des Nahtmaterials an den Vliesen besonders kritisch gegenüber Zugbelastungen sind, stand die Fadenausreißkraft in unserem Versuch im Zentrum des Interesses. Die Fadenausreißkraft wurde in der vorliegenden Arbeit nach 56-stündiger Vorinkubation in Kulturmedium analysiert, was in etwa der klinischen Situation, wie z. B. bei der Besiedelung von kollagenen Membranen mit Chondrozyten, entspricht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass deutlich höhere Zugbelastungen zum Fadenausriß bei Kollagenvliesen führten als bei dem synthetischen Ethisorb Vliesen.

Ein Modell zur Berechnung der am Schultergürtel während einer Abduktionsbewegungen wirkenden Muskelkräfte wurde von Dan Karlsson und Bo Peterson beschrieben (199). Dabei muss die Sehne des M.supraspinatus Kräften, die je nach Winkelstellung bis zu 100 N betragen können, standhalten. Verglichen mit den in unserer Studie ermittelten Kräften, die zum Fadenausriß in beiden Vliesen führten, würde dies bedeuten, dass beide analysierten Vliese in der getesteten Form nicht für den klinischen Einsatz geeignet wären.

Dennoch ist der Stellenwert insbesondere der PLA- und PGA-Polymere in der Medizin hoch. Sie kommen in diversen Modifizierungen bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen zur Knochen- und Knorpelregeneration vor (200). Strukturelle Modifikationen lassen sich relativ einfach durchführen. So können geeignete Netzwerke oder Schäume entstehen, die die gewünschten Zug- und/oder Steifigkeitsanforderungen aufweisen. Allerdings kann die Verschiebung des pH Wertes in den sauren Bereich durch hydrolytische Spaltprodukte wie Glykol- und Milchsäure zu einer komplikationsreichen inflammatorischen Gewebereaktion führen (201). Aus diesem Grund wird diese Materialgruppe in den letzten Jahren, insbesondere für die klinische Verwendung, eher kritisch bewertet. Aufgrund großer Vorteile synthetischer Scaffoldmaterialien, wie die mühelose Anpassung von Reißfestigkeit, Porengröße und Degradationsgeschwindigkeit, wird dieser Materialgruppe aber auch in Zukunft Aufmerksamkeit im TTE zukommen.

5. Zusammenfassung

Irreparable Sehnenverletzungen stellen nach wie vor ein großes therapeutisches Problem dar. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit sich Tenozyten aus verschiedenen Ursprungsgeweben für das scaffoldbasierte TTE eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus allen untersuchten Ausgangsgeweben (Bizepssehnen, vorderen Kreuzbändern und Semitendinosussehnen) sowohl durch EGV wie auch durch ZAW vitale Zellen isoliert werden. Durch die EGV konnte eine größere absolute Zellausbeute generiert werden und die für den Isolationsvorgang benötigte Zeit war deutlich geringer als bei der ZAW. Dabei konnten aus Sehngewebe älterer Spender, insbesondere aus Bizepssehnen, mehr Zellen als aus Biopsien jüngerer Spender (Semitendinosussehnen) gewonnen werden. Jedoch zeigten Zellen, die durch die EGV separiert wurden, in der *in vitro* Kultur tendenziell einen höheren Anteil morphologisch dedifferenzierter Zellen als die Zellkulturen, die durch ZAW generiert wurden.

Das Genexpressionsverhalten war in allen Ausgangsgeweben, unabhängig von der verwendeten Isolationsmethodik, ähnlich. Wesentliche tenogene Strukturgene wie Kollagen Typ I und III, Decorin, Tenascin-C und Fibronektin wurden in allen Zellkulturen der dritten Zellpassage exprimiert. Die Expression des tenogenen Differenzierungsmarkers Scleraxis konnte in fast allen, die des Differenzierungsmarkers Tenomodulin, bis auf eine Ausnahme, in keiner Tenozytenkultur nachgewiesen werden. Dies, sowie die starke Expression an Aggrecan, einem Marker der Chondrozyten, und der vereinzelte schwache Nachweis einer Osteopontinexpression, deuten auf das Dedifferenzierungspotenzial der Tenozyten in Kultur hin.

Die quantitative Expressionsanalyse der Strukturgene Kollagen Typ I und Decorin zeigte, dass in Kulturen der Bizepssehne, die durch EGV gewonnen wurden, eine höhere Expression an Kollagen Typ I nachweisbar war. Die Decorinexpression verhielt sich entgegengesetzt. In Kulturen des vorderen Kreuzbandes war die gleiche Tendenz erkennbar, die jedoch in Kulturen der Semitendinosussehne nicht festzustellen war.

Aufgrund der Zelltoxizität des enzymatischen Isolationsverfahrens und der Beobachtungen morphologischer Dedifferenzierungen der Zellen in der *in vitro* Kultur, sowie unter Berücksichtigung der quantitativen Expressionsanalysen, kommt die vorliegende Arbeit zu dem Schluss, dass Zellkulturen, gewonnen durch die schonende ZAW aus der Bizepssehne, für zukünftige Untersuchungen zu favorisieren sind.

Jedoch muss kritisch angemerkt werden, dass für den klinischen Einsatz die Zellgewinnung durch EGV deutlich effizienter ist. Möglicherweise kann durch eine

Optimierung dieses Isolationsverfahrens hinsichtlich der Zytotoxizität des Enzyms Kollagenase I eine Verbesserung der Zellqualität erreicht werden.

Zellen der vierten Zellpassage, die aus Bizepssehnen durch ZAW gewonnen wurden, konnten sowohl auf einem Kollagenvlies (Shoulder Patch) als auch auf einem synthetischen PGA/PDS Vlies (Ethisorb) angesiedelt werden. Die Zellen adhärten auf beiden Vliesen an den Vliesfasern, waren jedoch zwei Tage nach Besiedelung, insbesondere auf den Shoulder Patch Vliesen, vor allem in oberflächlichen Vliesschichten nachweisbar. Sowohl zwei als auch 14 Tage nach Zellbesiedlung waren auf den PGA/PDS Vliesen tendenziell mehr Zellen nachweisbar als auf den Kollagenvliesen. Nach zwei Wochen Besiedlungszeit konnte eine Zunahme der Zellzahlen auch in den basalen Vliesschichten histologisch festgestellt werden. Die histologischen Auswertungen der PGA/PDS Vliese zu diesem Zeitpunkt waren aufgrund von Faserdegradation jedoch nur eingeschränkt beurteilbar.

Eine wesentliche Anforderung, die für den klinischen Einsatz von Vliesen zur Deckung von RMR zu erfüllen ist, ist die Materialfestigkeit gegenüber Zugbelastungen. Die maximale Zugbelastung bis zum Fadenausriss nicht zellbesiedelter Vliese nach Vorinkubation in Kulturmedium war bei Shoulder Patch Vliesen deutlich höher als bei Ethisorb Vliesen. Verglichen mit Zahlen aus der Literatur lag die Fadenausreißkraft jedoch deutlich unter Zugkräften, die physiologisch an den Sehnen der Rotatorenmanschette wirken. Dies lässt den klinischen Einsatz beider Vliese zur Deckung großer transmuraler RMR in der untersuchten Form fraglich erscheinen. Hier bieten insbesondere die synthetischen Vliese auf Grund ihrer technisch gut reproduzierbar einzustellenden Materialeigenschaften einen Vorteil gegenüber den biologischen Vliesen, bei denen dies nur in sehr engen Grenzen möglich ist.

6. Fazit und Ausblick

Unsere Arbeitsgruppe ist der Meinung, dass die *in situ* Regeneration große Vorteile gegenüber dem klassischen „tissue engineering“ besitzt. Sie ist technisch leichter durchführbar und orientiert sich näher an klinischen Fragestellungen. Dies ist von großer Bedeutung, da eine mögliche spätere klinische Anwendung Grundlage der Forschungsarbeiten unseres Labors ist. Deshalb denken wir, dass die *in situ* Regeneration eher in der Lage ist, klinisch Anwendung zu finden als *in vitro* gefertigte artifizielle Gewebe des „tissue engineering“.

Zukünftige Experimente unserer Arbeitsgruppe werden als Ausgangsgewebe für die *in situ* Regeneration die Bizepssehne favorisieren. Sie ist einfach zu gewinnen, besitzt gute Kultivierungsfähigkeiten und ist den anderen verwendeten Sehnen dieser Arbeit in ihrem Genexpressionsverhalten gleichwertig.

Aufgrund der langen Kultivierungszeit ist davon auszugehen, dass sich die Zellisolation durch ZAW klinisch langfristig nicht durchsetzen wird. Deshalb sollte nach weiterem Optimierungspotential der EGV gesucht werden. Dauer der enzymatischen Verdauung, sowie Enzymkonzentration könnten noch weiter optimiert werden. Erste kleinere Experimente unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass eine fraktionierte Zellgewinnung, beispielsweise alle 2 Std, eine höhere primäre Zellausbeute generieren könnte.

Eine Zellproliferation ist sowohl auf Polyestervliesen, als auch auf Kollagenvliesen möglich. Das Ethisorb Vlies besitzt leider keine hohe Resistenz gegenüber Zugbelastungen, so dass nach Implantation Risse des Vlieses sehr wahrscheinlich wären. Das Shoulder Patch (Fi.TETEC, Reutlingen) liefert gute mechanische Zugbelastungsergebnisse. Sein Verhalten nach *in vivo* Implantation sollte in tierexperimentellen Arbeiten, beispielsweise an einem Schafmodel, weiter untersucht werden.

Ich bin davon überzeugt, dass dieser Forschungsbereich aufgrund der klinischen Relevanz an Bedeutung gewinnen wird.

7. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α-Kette	alpha Kette
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp	base pairs (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
durchschn.	durchschnittlich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGV	enzymatische Gewebeverdauung
EtBr	Ethidiumbromid
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fi.	Firma

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H.E.- Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hz	Hertz
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
m	männlich
M.	Musculus
mA	Miliampère
MAP	mitogen-activated protein
Mg	Miligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	milimolar
MPa	Megapascal
mRNA	messenger ribonucleic acid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor-BB
PDS	poly-P-Dioxanon
PGA	polyglycolic acid
PGE2	Prostaglandin E2
PLA	polylactic acid
PLGA	poly (lactide-co-glycolide) acid
PLLA	poly-L- lactic acid
pN	Piconewton

RGD-Aminosäuresequenz	Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin und Asparaginsäure, kurz:Arg-Gly-Asp, Einbuchstaben-Code: RGD
Rho A	Ras homologe Genfamilie, Mitglied A
RMR	Rotatorenmanschettenrupturen
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/Minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s.	siehe
S.	Seite
sec	Sekunde
Std	Stunde
TAE Puffer	Tris-acetat-EDTA Puffer
TTE	tendon tissue engineering
U	Unit
UCLA	University of Carlifornia at Los Angeles
V	Volt
VKB	vorderes Kreuzband
w	weiblich
ZAW	Zellauswanderung

8. Literaturverzeichnis

- (1) Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol* 1986 Jul;103(1):231-40.
- (2) Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000 Dec;10(6):312-20.
- (3) Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, De MC. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62(4):583-98.
- (4) Moore MJ, De BA. A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity. *J Anat* 1987 Aug;153:163-9.
- (5) Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med* 1989 Dec;8(6):371-84.
- (6) Grant ME. From collagen chemistry towards cell therapy - a personal journey. *Int J Exp Pathol* 2007 Aug;88(4):203-14.
- (7) Ramshaw JA, Shah NK, Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* 1998;122(1-2):86-91.
- (8) Beck K, Brodsky B. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol* 1998;122(1-2):17-29.
- (9) Young BB, Zhang G, Koch M, Birk DE. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J Cell Biochem* 2002;87(2):208-20.
- (10) Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005 Apr 1;118(Pt 7):1341-53.
- (11) Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, van der RM. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol* 1996 Nov;15(5):341-8.
- (12) Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 2006;39(1):1-20.
- (13) Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978;6(1):11-23.
- (14) Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* 2003 Oct;36(10):1529-53.
- (15) Sun YL, Luo ZP, Fertala A, An KN. Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Jul 12;295(2):382-6.
- (16) Canty EG, Kadler KE. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002 Dec;133(4):979-85.

- (17) Hodge A. J, Petruska J. A. Aspects of protein structure. Ed. by G. N. Ramachandran, Academic Press. New York. 1963:289–300.
- (18) Silver FH, Horvath I, Foran DJ. Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the alpha1-chains found in types I-III collagen. *J Theor Biol* 2002 May 21;216(2):243-54.
- (19) Silver FH, Birk DE. Molecular structure of collagen in solution: comparison of types I, II, III and V. *Int.J.Biol.Macromol Int.* 6. 1984: 125-132.
- (20) Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):1852-6.
- (21) Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med* 2000 Jul;28(4):499-505.
- (22) Riley GP. Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports* 2005 Aug;15(4):241-51.
- (23) Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J* 2000 Aug 15;350 Pt 1:181-8.
- (24) Svensson L, Heinegard D, Oldberg A. Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem* 1995 Sep 1;270(35):20712-6.
- (25) Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 1996 Dec 13;271(50):31767-70.
- (26) Pins GD, Christiansen DL, Patel R, Silver FH. Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys J* 1997 Oct;73(4):2164-72.
- (27) Scott JE. Proteoglycan: collagen interactions and corneal ultrastructure. *Biochem Soc Trans* 1991 Nov;19(4):877-81.
- (28) Liu X, Yeh ML, Lewis JL, Luo ZP. Direct measurement of the rupture force of single pair of decorin interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Dec 23;338(3):1342-5.
- (29) Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 2000 Nov 13;151(4):779-88.
- (30) Orend G, Huang W, Olayioye MA, Hynes NE, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* 2003 Jun 19;22(25):3917-26.
- (31) Fischer D, Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R, Adams JC. Cell-adhesive responses to tenascin-C splice variants involve formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell* 1997 Oct;8(10):2055-75.

- (32) Midwood KS, Schwarzbauer JE. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell* 2002 Oct;13(10):3601-13.
- (33) Martin D, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C signaling through induction of 14-3-3 tau. *J Cell Biol* 2003 Jan 20;160(2):171-5.
- (34) Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Jun;36(6):1085-9.
- (35) Brent AE, Tabin CJ. FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development* 2004 Aug;131(16):3885-96.
- (36) Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003 Apr 18;113(2):235-48.
- (37) Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* 2007 Jul;134(14):2697-708.
- (38) Brandau O, Meindl A, Fassler R, Aszodi A. A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Dev Dyn* 2001 May;221(1):72-80.
- (39) Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y. Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jul 29;333(2):299-307.
- (40) Docheva D, Hunziker EB, Fassler R, Brandau O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol* 2005 Jan;25(2):699-705.
- (41) Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol* 2006 Oct 1;298(1):234-47.
- (42) Smith TG, Sweetman D, Patterson M, Keyse SM, Munsterberg A. Feedback interactions between MKP3 and ERK MAP kinase control scleraxis expression and the specification of rib progenitors in the developing chick somite. *Development* 2005 Mar;132(6):1305-14.
- (43) Edom-Vovard F, Schuler B, Bonnin MA, Teillet MA, Duprez D. Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol* 2002 Jul 15;247(2):351-66.
- (44) Clayton RA, Court-Brown CM. The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. *Injury* 2008 Dec;39(12):1338-44.
- (45) Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, Teefey SA. The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 2006 Aug;88(8):1699-704.

- (46) Karduna AR, Williams GR, Williams JL, Iannotti JP. Kinematics of the glenohumeral joint: influences of muscle forces, ligamentous constraints, and articular geometry. *J Orthop Res* 1996 Nov;14(6):986-93.
- (47) Rodosky MW, Harner CD, Fu FH. The role of the long head of the biceps muscle and superior glenoid labrum in anterior stability of the shoulder. *Am J Sports Med* 1994 Jan;22(1):121-30.
- (48) Hasvold T, Johnsen R. Headache and neck or shoulder pain--frequent and disabling complaints in the general population. *Scand J Prim Health Care* 1993 Sep;11(3):219-24.
- (49) Tempelhof S, Rupp S, Seil R. Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elbow Surg* 1999 Jul;8(4):296-9.
- (50) Yamaguchi K, Tetro AM, Blam O, Evanoff BA, Teefey SA, Middleton WD. Natural history of asymptomatic rotator cuff tears: a longitudinal analysis of asymptomatic tears detected sonographically. *J Shoulder Elbow Surg* 2001 May;10(3):199-203.
- (51) Dias D, Matos M, Daltro C, Guimaraes A. Clinical and Functional Profile of patients with the Painful Shoulder Syndrome (PSS). *Ortop Traumatol Rehabil* 2008 Nov;10(6):547-53.
- (52) Weber M, Rompe G. Die Entstehung und Beurteilung der sog. Rotatorenmanschettenrupturen. *Z Orthop.* (125). 1987: 108-119.
- (53) Hawkins RJ, Morin WD, Bonutti PM. Surgical treatment of full-thickness rotator cuff tears in patients 40 years of age or younger. *J Shoulder Elbow Surg* 1999 May;8(3):259-65.
- (54) Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1991 Dec;73(10):1507-25.
- (55) Wilson CL, Duff CL. Pathologic study of degeneration and rupture of the supraspinatus. *Arch Surg.* 47, 121-135. 1943.
- (56) Nirschl RP. Rotator cuff tendinitis: basic concepts of pathoetiology. *Instr Course Lect* 1989;38:439-45.
- (57) Codman EA. The Shoulder: Rupture of the Supraspinatus Tendon and Other Lesions in or about the Subacromial Bursa. Thomas Todd Co. Boston:. 1934. ISBN0898747317, 9780898747317.
- (58) Neer CS. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res* 1983 Mar;(173):70-7.
- (59) Patte D. Classification of rotator cuff lesions. *Clin Orthop Relat Res* 1990 May;(254):81-6.
- (60) Thomazeau H, Boukobza E, Morcet N, Chaperon J, Langlais F. Prediction of rotator cuff repair results by magnetic resonance imaging. *Clin Orthop Relat Res* 1997 Nov;(344):275-83.
- (61) Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty infiltration of disrupted rotator cuff muscles. *Rev Rhum Engl Ed* 1995 Jun;62(6):415-22.

- (62) Millstein ES, Snyder SJ. Arthroscopic management of partial, full-thickness, and complex rotator cuff tears: indications, techniques, and complications. *Arthroscopy* 2003 Dec;19 Suppl 1:189-99.
- (63) Habermeyer P, Schiller K, Schweiberer L. *Schulterchirurgie*. Urban u. Schwarzenberg. München Wien Baltimore, 1990 (1.Auflage). ISBN: 3541124512.
- (64) Pai VS, Lawson DA. Rotator cuff repair in a district hospital setting: outcomes and analysis of prognostic factors. *J Shoulder Elbow Surg* 2001 May;10(3):236-41.
- (65) Haberneke H, Schmid L, Frauenschuh E. Five year results of rotator cuff repair. *Br J Sports Med* 1999 Dec;33(6):430-3.
- (66) Feng S, Guo S, Nobuhara K, Hashimoto J, Mimori K. Prognostic indicators for outcome following rotator cuff tear repair. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2003 Dec;11(2):110-6.
- (67) Hatstrup SJ. Rotator cuff repair: relevance of patient age. *J Shoulder Elbow Surg* 1995 Mar;4(2):95-100.
- (68) Cofield RH, Parvizi J, Hoffmeyer PJ, Lanzer WL, Ilstrup DM, Rowland CM. Surgical repair of chronic rotator cuff tears. A prospective long-term study. *J Bone Joint Surg Am* 2001 Jan;83-A(1):71-7.
- (69) Ellman H, Hunker G, Bayer M. Repair of the rotator cuff. End-result study of factors influencing reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 1986 Oct;68(8):1136-44.
- (70) Iannotti JP. Full-Thickness Rotator Cuff Tears: Factors Affecting Surgical Outcome. *J Am Acad Orthop Surg* 1994 Mar;2(2):87-95.
- (71) Dunn WR, Schackman BR, Walsh C, Lyman S, Jones EC, Warren RF, et al. Variation in orthopaedic surgeons' perceptions about the indications for rotator cuff surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2005 Sep;87(9):1978-84.
- (72) Chen TM, Rozen WM, Pan WR, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI. The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clin Anat* 2009 Apr;22(3):377-85.
- (73) Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon* 2005 Oct;3(5):309-16.
- (74) Nakamura N. Gene therapy and ligament healing In: *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule*. New Jersey, Totowa: 2005. ISBN 1-58829-174-X.
- (75) Petri M, Dobrow R, Neiman R, Whiting-O'Keefe Q, Seaman WE. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of the treatment of the painful shoulder. *Arthritis Rheum* 1987 Sep;30(9):1040-5.
- (76) Adebajo AO, Nash P, Hazleman BL. A prospective double blind dummy placebo controlled study comparing triamcinolone hexacetonide injection with oral diclofenac 50 mg TDS in patients with rotator cuff tendinitis. *J Rheumatol* 1990 Sep;17(9):1207-10.
- (77) Young JL, Herring SA, Press JM. The influence of the spine on the shoulder in the throwing athletes. *J Back Musculoskeletal Rehabil.* 1996 Jul;5-17.

- (78) Ekeberg OM, Bautz-Holter E, Tveita EK, Juel NG, Kvalheim S, Brox JI. Subacromial ultrasound guided or systemic steroid injection for rotator cuff disease: randomised double blind study. *BMJ* 2009;338:a3112.
- (79) Hawkins RH, Dunlop R. Nonoperative treatment of rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res* 1995 Dec;(321):178-88.
- (80) Ogilvie-Harris DJ, Demaziere A. Arthroscopic debridement versus open repair for rotator cuff tears. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Br* 1993 May;75(3):416-20.
- (81) T'Jonck L, Lysens R, De SL, Bellemans J, Stoffelen D, Tirez B, et al. Open versus arthroscopic subacromial decompression: analysis of one-year results. *Physiother Res Int* 1997;2(2):46-61.
- (82) Husby T, Haugstvedt JR, Brandt M, Holm I, Steen H. Open versus arthroscopic subacromial decompression: a prospective, randomized study of 34 patients followed for 8 years. *Acta Orthop Scand* 2003 Aug;74(4):408-14.
- (83) Hata Y, Saitoh S, Murakami N, Seki H, Nakatsuchi Y, Takaoka K. A less invasive surgery for rotator cuff tear: mini-open repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2001 Jan;10(1):11-6.
- (84) Kronberg M, Wahlstrom P, Brostrom LA. Shoulder function after surgical repair of rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg* 1997 Mar;6(2):125-30.
- (85) Mellado JM, Calmet J, Olona M, Ballabriga J, Camins A, Perez del PL, et al. MR assessment of the repaired rotator cuff: prevalence, size, location, and clinical relevance of tendon rerupture. *Eur Radiol* 2006 Oct;16(10):2186-96.
- (86) Neviaser JS, Neviaser RJ, Neviaser TJ. The repair of chronic massive ruptures of the rotator cuff of the shoulder by use of a freeze-dried rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1978 Jul;60(5):681-4.
- (87) Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, Clancy WG, Jr. Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2006 Mar;34(3):392-6.
- (88) Aoki M, Okamura K, Fukushima S, Takahashi T, Ogino T. Transfer of latissimus dorsi for irreparable rotator-cuff tears. *J Bone Joint Surg Br* 1996 Sep;78(5):761-6.
- (89) Boileau P, Chuinard C, Roussanne Y, Neyton L, Trojani C. Modified latissimus dorsi and teres major transfer through a single delto-pectoral approach for external rotation deficit of the shoulder: as an isolated procedure or with a reverse arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg* 2007 Nov;16(6):671-82.
- (90) Spahn G, Kirschbaum S, Klinger HM. A study for evaluating the effect of the deltoid-flap repair in massive rotator cuff defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006 Apr;14(4):365-72.
- (91) Celli L, Rovesta C, Marongiu MC, Manzieri S. Transplantation of teres major muscle for infraspinatus muscle in irreparable rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg* 1998 Sep;7(5):485-90.
- (92) Warner JJ. Management of massive irreparable rotator cuff tears: the role of tendon transfer. *Instr Course Lect* 2001;50:63-71.

- (93) Wall B, Nove-Josserand L, O'Connor DP, Edwards TB, Walch G. Reverse total shoulder arthroplasty: a review of results according to etiology. *J Bone Joint Surg Am* 2007 Jul;89(7):1476-85.
- (94) Sirveaux F, Favard L, Oudet D, Huquet D, Walch G, Mole D. Grammont inverted total shoulder arthroplasty in the treatment of glenohumeral osteoarthritis with massive rupture of the cuff. Results of a multicentre study of 80 shoulders. *J Bone Joint Surg Br* 2004 Apr;86(3):388-95.
- (95) Liu Y, Ramanath HS, Wang DA. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *Trends Biotechnol* 2008 Apr;26(4):201-9. (Abschnitte 1.5.1-1.5.3 strukturell angelegt)
- (96) Cao Y, Liu Y, Liu W, Shan Q, Buonocore SD, Cui L. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plast Reconstr Surg* 2002 Oct;110(5):1280-9.
- (97) Lu HH, Cooper JA, Jr., Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials* 2005 Aug;26(23):4805-16.
- (98) Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Eng* 2003 Jun;9(3):431-9.
- (99) Wan Y, Chen W, Yang J, Bei J, Wang S. Biodegradable poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) multiblock copolymer: synthesis and evaluation of cell affinity. *Biomaterials* 2003 Jun;24(13):2195-203.
- (100) Bostman OM, Pihlajamäki HK. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop Relat Res* 2000 Feb;(371):216-27.
- (101) Jansson V, Müller PE, Thal S, Arnholz C, Milz S, Koch KU, et al. [A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study]. *Orthopäde* 2000 Feb;29(2):151-7.
- (102) Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res* 2008 May;63(5):492-6.
- (103) Garvin J, Qi J, Maloney M, Banes AJ. Novel system for engineering bioartificial tendons and application of mechanical load. *Tissue Eng* 2003 Oct;9(5):967-79.
- (104) Gentleman E, Livesay GA, Dee KC, Nauman EA. Development of ligament-like structural organization and properties in cell-seeded collagen scaffolds in vitro. *Ann Biomed Eng* 2006 May;34(5):726-36.
- (105) Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006 Feb;12(2):369-79.
- (106) Juncosa-Melvin N, Shearn JT, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, et al. Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006 Aug;12(8):2291-300.

- (107) Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Butler DL. Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair. *Tissue Eng* 2006 Apr;12(4):681-9.
- (108) Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004 Nov 15;71(2):343-54.
- (109) Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000 Dec;21(24):2589-98.
- (110) Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005 Jun;26(18):3919-28.
- (111) Bagnaninchi PO, Yang Y, Zghoul N, Maffulli N, Wang RK, Haj AJ. Chitosan microchannel scaffolds for tendon tissue engineering characterized using optical coherence tomography. *Tissue Eng* 2007 Feb;13(2):323-31.
- (112) Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Yamane S, Masuko T, Minami A, et al. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005 Sep 1;74(3):338-46.
- (113) Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Suenaga N, Sawaguchi N, Shimode K, et al. Application of tissue engineering techniques for rotator cuff regeneration using a chitosan-based hyaluronan hybrid fiber scaffold. *Am J Sports Med* 2005 Aug;33(8):1193-201.
- (114) Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys* 2004 Feb 15;422(2):161-7.
- (115) Huang D, Balian G, Chhabra AB. Tendon tissue engineering and gene transfer: the future of surgical treatment. *J Hand Surg [Am]* 2006 May;31(5):693-704.
- (116) Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T, Shakibaei M. Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 2004 Sep;122(3):219-28.
- (117) Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Stahlmann R. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology* 2005 Aug 15;212(1):24-36.
- (118) Cao Y, Vacanti JP, Ma X, Paige KT, Upton J, Chowanski Z, et al. Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes. *Transplant Proc* 1994 Dec;26(6):3390-2.
- (119) Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng* 2006 Jul;12(7):1843-9.
- (120) Lui PP, Fu SC, Chan LS, Hung LK, Chan KM. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. *J Histochem Cytochem* 2009 Feb;57(2):91-100.
- (121) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

- (122) Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Viability of allogeneic bone marrow stromal cells following local delivery into patella tendon in rabbit model. *Cell Transplant* 2004;13(6):649-57.
- (123) Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998 Jul;16(4):406-13.
- (124) Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Eng* 2003 Jun;9(3):431-9.
- (125) Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 2007 Mar;25(3):750-60.
- (126) Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 2001;82(4):583-90.
- (127) Liu W, Chen B, Deng D, Xu F, Cui L, Cao Y. Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model. *Tissue Eng* 2006 Apr;12(4):775-88.
- (128) Deng D, Liu W, Xu F, Wu XL, Wei X, Zhong B, et al. [In vitro tendon engineering using human dermal fibroblasts]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008 Apr 1;88(13):914-8.
- (129) Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, et al. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A* 2003 Nov 1;67(2):559-70.
- (130) Qin TW, Yang ZM, Wu ZZ, Xie HQ, Qin J, Cai SX. Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) substrates. *Biomaterials* 2005 Nov;26(33):6635-42.
- (131) Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004 Mar;25(7-8):1289-97.
- (132) Sahoo S, Ouyang H, Goh JC, Tay TE, Toh SL. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng* 2006 Jan;12(1):91-9.
- (133) Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue Eng* 2006 Jul;12(7):1937-43.
- (134) Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator. *Tissue Eng Part A* 2009 Apr;15(4):787-95.
- (135) Yamamoto E, Kogawa D, Tokura S, Hayashi K. Effects of the frequency and duration of cyclic stress on the mechanical properties of cultured collagen fascicles from the rabbit patellar tendon. *J Biomech Eng* 2005 Dec;127(7):1168-75.

- (136) Cao D, Liu W, Wei X, Xu F, Cui L, Cao Y. In vitro tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: a preliminary report. *Tissue Eng* 2006 May;12(5):1369-77.
- (137) Heckmann L. Gewebeersatz von Sehnen und Bändern: Untersuchungen zum Einfluss löslicher Faktoren und verschiedener Matrices auf humane multipotente mesenchymale Stromazellen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät Ulm, 2007:28-30.
- (138) Crosby AH, Edwards SJ, Murray JC, Dixon MJ. Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics* 1995 May 1;27(1):155-60.
- (139) Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.
- (140) Schmitt SC, Wiedmann-Al-Ahmad M, Kuschnierz J, Al-Ahmad A, Huebner U, Schmelzeisen R, et al. Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects. *J Mater Sci Mater Med* 2008 Mar;19(3):1441-50.
- (141) Maffulli N, Reaper J, Ewen SW, Waterston SW, Barrass V. Chondral metaplasia in calcific insertional tendinopathy of the Achilles tendon. *Clin J Sport Med* 2006 Jul;16(4):329-34.
- (142) Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 1998 Nov;193 (Pt 4):481-94.
- (143) Kryger GS, Chong AK, Costa M, Pham H, Bates SJ, Chang J. A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *J Hand Surg Am* 2007 May;32(5):597-605.
- (144) Dokumcu Z, Ergun O, Celik HA, Aydemir S, Sezak M, Ozok G, et al. Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. *Burns* 2008 Nov;34(7):935-41.
- (145) Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med* 2007 Apr;41(4):232-40.
- (146) Gronowicz GA, Jhaveri A, Clarke LW, Aronow MS, Smith TH. Therapeutic touch stimulates the proliferation of human cells in culture. *J Altern Complement Med* 2008 Apr;14(3):233-9.
- (147) Xiong Y, Yang HJ, Feng J, Shi ZL, Wu LD. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res* 2009 Mar;37(2):407-16.
- (148) Birch HL, Worboys S, Eissa S, Jackson B, Strassburg S, Clegg PD. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol* 2008 Apr;27(3):182-9.
- (149) Birch HL, Bailey JV, Bailey AJ, Goodship AE. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. *Equine Vet J* 1999 Sep;31(5):391-6.

- (150) Avery NC, Bailey AJ. Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2005 Aug;15(4):231-40.
- (151) Reddy GK. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp Diabetes Res* 2004 Apr;5(2):143-53.
- (152) Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, et al. Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2008 Mar;36(3):533-8.
- (153) Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, et al. Characteristics at haematoxylin and eosin staining of ruptures of the long head of the biceps tendon. *Br J Sports Med* 2009 Aug;43(8):603-7.
- (154) Glazebrook MA, Wright JR, Jr., Langman M, Stanish WD, Lee JM. Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res* 2008 Jun;26(6):840-6.
- (155) Franchi M, Trire A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal* 2007;7:404-20.
- (156) Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res* 1993 Sep;8(9):1019-29.
- (157) Hinton RJ, Serrano M, So S. Differential gene expression in the perichondrium and cartilage of the neonatal mouse temporomandibular joint. *Orthod Craniofac Res* 2009 Aug;12(3):168-77.
- (158) Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, et al. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem* 2006 Aug 15;98(6):1436-49.
- (159) Chokalingam K, Juncosa-Melvin N, Hunter SA, Gooch C, Frede C, Florert J, et al. Tensile stimulation of murine stem cell-collagen sponge constructs increases collagen type I gene expression and linear stiffness. *Tissue Eng Part A* 2009 Sep;15(9):2561-70.
- (160) Chen CH, Tsai JL, Wang YH, Lee CL, Chen JK, Huang MH. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. *J Orthop Res* 2009 May;27(5):646-50.
- (161) Bosch G, de MM, van BR, van Schie HT, van de Lest CH, van Weeren PR. The effect of focused extracorporeal shock wave therapy on collagen matrix and gene expression in normal tendons and ligaments. *Equine Vet J* 2009 Apr;41(4):335-41.
- (162) Xue M, Smith MM, Little CB, Sambrook P, March L, Jackson CJ. Activated protein C mediates a healing phenotype in cultured tenocytes. *J Cell Mol Med* 2009 Apr;13(4):749-57.
- (163) Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar 7;1477(1-2):349-60.
- (164) Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, et al. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 2001 Sep 4;104(10):1171-5.

- (165) Li F, Li B, Wang QM, Wang JH. Cell shape regulates collagen type I expression in human tendon fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008 Apr;65(4):332-41.
- (166) Thampatty BP, Wang JH. A new approach to study fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007 Jan;64(1):1-5.
- (167) Zhu J, Li J, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, et al. The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure. *Biomaterials* 2010 Sep;31(27):6952-8.
- (168) Domm C, Schunke M, Christesen K, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 Jan;10(1):13-22.
- (169) Karousou E, Ronga M, Vigetti D, Passi A, Maffulli N. Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture. *Clin Orthop Relat Res* 2008 Jul;466(7):1577-82.
- (170) Corps AN, Robinson AH, Movin T, Costa ML, Hazleman BL, Riley GP. Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy. *Rheumatology (Oxford)* 2006 Mar;45(3):291-4.
- (171) Yokota A, Gimbel JA, Williams GR, Soslowsky LJ. Supraspinatus tendon composition remains altered long after tendon detachment. *J Shoulder Elbow Surg* 2005 Jan;14(1 Suppl S):72S-8S.
- (172) Chen CH, Marymont JV, Huang MH, Geyer M, Luo ZP, Liu X. Mechanical strain promotes fibroblast gene expression in presence of corticosteroid. *Connect Tissue Res* 2007;48(2):65-9.
- (173) Maeda E, Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Differential regulation of gene expression in isolated tendon fascicles exposed to cyclic tensile strain in vitro. *J Appl Physiol* 2009 Feb;106(2):506-12.
- (174) Chiquet-Ehrismann R, Tannheimer M, Koch M, Brunner A, Spring J, Martin D, et al. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 1994 Dec;127(6 Pt 2):2093-101.
- (175) Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol* 2009 Aug;107(2):399-407.
- (176) Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, et al. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskelet Disord* 2009;10:27.
- (177) Trylovich DJ, Cobb CM, Pippin DJ, Spencer P, Killoy WJ. The effects of the Nd:YAG laser on in vitro fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces. *J Periodontol* 1992 Jul;63(7):626-32.
- (178) Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)*. 2004. 131-142.

- (179) Asundi KR, King KB, Rempel DM. Evaluation of gene expression through qRT-PCR in cyclically loaded tendons: an in vivo model. *Eur J Appl Physiol* 2008 Feb;102(3):265-70.
- (180) Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, van der LJ, Hagg R, Tommasini R, et al. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004 Jul;12(7):525-35.
- (181) Sasano Y, Li HC, Zhu JX, Imanaka-Yoshida K, Mizoguchi I, Kagayama M. Immunohistochemical localization of type I collagen, fibronectin and tenascin C during embryonic osteogenesis in the dentary of mandibles and tibias in rats. *Histochem J* 2000 Oct;32(10):591-8.
- (182) Jelinsky SA, Archambault J, Li L, Seeherman H. Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues. *J Orthop Res* 2009 Sep 24.
- (183) Watahiki J, Yamaguchi T, Enomoto A, Irie T, Yoshie K, Tachikawa T, et al. Identification of differentially expressed genes in mandibular condylar and tibial growth cartilages using laser microdissection and fluorescent differential display: chondromodulin-I (ChM-1) and tenomodulin (TeM) are differentially expressed in mandibular condylar and other growth cartilages. *Bone* 2008 Jun;42(6):1053-60.
- (184) Kuo CK, Tuan RS. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008 Oct;14(10):1615-27.
- (185) de MM, Koevoet W, van Schie HT, Kops N, Jahr H, Verhaar JA, et al. In vitro model to study chondrogenic differentiation in tendinopathy. *Am J Sports Med* 2009 Jun;37(6):1214-22.
- (186) Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ. Fibrocartilage in the attachment zones of the quadriceps tendon and patellar ligament of man. *J Anat* 1990 Aug;171:155-62.
- (187) Wunsch L, Ehlers EM, Russlies M. Matrix testing for urothelial tissue engineering. *Eur J Pediatr Surg* 2005 Jun;15(3):164-9.
- (188) Martin I, Shastri VP, Padera RF, Yang J, Mackay AJ, Langer R, et al. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res* 2001 May;55(2):229-35.
- (189) Skodacek D, Brandau S, Deutschle T, Lang S, Rotter N. Growth factors and scaffold composition influence properties of tissue engineered human septal cartilage implants in a murine model. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008 Oct;21(4):807-16.
- (190) Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002 Mar;23(6):1461-9.
- (191) Safdar A, Kohn LF, Narayan KK. Acute foreign body reaction to synthetic dural graft. *Am J Med* 2002 Oct 15;113(6):529.
- (192) Unsal B, Ozcan G, Tuter G, Kurtis B, Yalim M. Evaluation of initial attachment of human gingival fibroblast cells to biodegradable membranes in vitro by light and scanning electron microscopy. *J Oral Sci* 1999 Jun;41(2):57-60.

- (193) Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontal Res* 2001 Oct;36(5):322-7.
- (194) Marinucci L, Lilli C, Guerra M, Belcastro S, Becchetti E, Stabellini G, et al. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 2003 Nov 1;67(2):504-9.
- (195) Beier JP, Klumpp D, Rudisile M, Dersch R, Wendorff JH, Bleiziffer O, et al. Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. *BMC Biotechnol* 2009;9:34.
- (196) Hadjipanayi E, Mudera V, Brown RA. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *J Tissue Eng Regen Med* 2009 Feb;3(2):77-84.
- (197) Matsumura Y, Ujihira M, Nogawa S, Kimura K, Ichikawa H, Mabuchi K. Investigation of the influence of cell density of human fibroblasts cryopreserved inside collagen sponges at various cooling rates. *Cryo Letters* 2007 Sep;28(5):337-46.
- (198) Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res* 2004 Aug;15(4):443-9.
- (199) Karlsson D, Peterson B. Towards a model for force predictions in the human shoulder. *J Biomech* 1992 Feb;25(2):189-99.
- (200) Ruuskanen MM, Kallioinen MJ, Kaarela OI, Laiho JA, Tormala PO, Waris TJ. The role of polyglycolic acid rods in the regeneration of cartilage from perichondrium in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1991;25(1):15-8.
- (201) Spain TL, Agrawal CM, Athanasiou KA. New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng* 1998;4(4):343-52.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: hierarchischer Aufbau der Kollagenfaserstruktur einer Sehne.	3
Abbildung 2: Funktion von Syndecan und Tenascin C.	5
Abbildung 3 A und B: Aufbau und Muskeln der Rotatorenmanschette	7
Abbildung 4: Kollagenvlies (Shoulder Patch) und PGA/PDS Vlies (Ethisorb)	24
Abbildung 5: benötigte Materialien zur Zellisolation.....	31
Abbildung 6: Sehne nativ und nach Präparation.	32
Abbildung 7: Der PCR Zyklus schematisch.....	37
Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Absorptionsmessung schematisch.....	40
Abbildung 9: Präparation eines Vlieses vor dem Anbringen einer U-Naht.....	41
Abbildung 10: Darstellung eines U-Naht Stiches.....	42
Abbildung 11: Zellausbeute nach EGV.....	46
Abbildung 12: Chronologie der Zellauswanderung.....	47
Abbildung 13: primäre Tenozytenkulturen Passage 3	48
Abbildung 14: Anteil dedifferenzierter Zellen im Gesichtsfeld.....	49
Abbildung 15: Überlebensrate von Fibroblasten in Kollagenase I.....	50
Abbildung 16: Genexpression von Tenozyten	51
Abbildung 17: relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Kollagen Typ I alpha I.....	53
Abbildung 18: relative Quantifizierung des m-RNA Gehaltes von Decorin.....	53
Abbildung 19: Proliferation von Tenozyten auf Vliesen im Verlauf.....	55
Abbildung 20: H.E-Färbung von zellbesiedelten Vliesen nach 2 Tagen.....	56
Abbildung 21: H.E-Färbung von zellbesiedelten Vliesen nach 14 Tage.....	57
Abbildung 22: Fadenausreißkraft nach U-Naht Befestigung.....	58

10. Lebenslauf

Name: Markus Udo Wagenhäuser

Geburtsdatum: 07.10.1983

Geburtsort: Würzburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1990-1994 Klosterschule Dachau (Grundschule)
1994-1997 Josef-Effner-Gymnasium Dachau
1997-1999 Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
1999-2000 Aarden-Lawn-School in Henley in Arden
2000-2003 Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau

Zivildienst: 2003-2004 Amper Kliniken Dachau (Intensivstation)

Studium: 2004-2006 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
(Humanmedizin vorklinischer Abschnitt)
2006-2011 Ludwig-Maximilians-Universität München
(Humanmedizin klinischer Abschnitt)

Famulaturen: 2007 Amper Kliniken Dachau, Abteilung für
Visceralchirurgie (Prof. Dr. med. Horst-Günther Rau)
2008 Gemeinschaftspraxis Radiologie-Strahlentherapie-
Nuklearmedizin Dres. Wuttge und Kollegen, München
2008 Klinikum Starnberg, Abteilung für Allgemeinchirurgie
(Prof. Dr. med. Arnold Trupka)
2009 Asklepios Fachkliniken München-Gauting, Abteilung
für Thoraxchirurgie (Prof. Dr. Dr. med. Rudolf Hatz, FACS)

Praktisches Jahr: Februar 2010-Juni 2010 Schulthess Klinik, Zürich
(Orthopädie)
Juni 2010-Oktober 2010 Victoria Hospital, Wynberg,
CapeTown (Innere Medizin)
Oktober 2010-Januar 2011 Klinikum Ingolstadt, Ingolstadt
(Chirurgie)

Abschlüsse:

- 2001 GCSE (General Certificate of Secondary Education),
Aarden-Lawn-School in Henley in Arden
- 2002 Delf (Diplôme d'Etudes en Langue Française) Degré
1, L'Institut français de Munich
- 2003 allgemeine Hochschulreife, Ignaz-Taschner-
Gymnasium Dachau
- 2006 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen
- 2008 Team-G Zertifikat, Ludwig-Maximilians-Universität
München
- 2011 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ludwig-
Maximilians-Universität München

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing Volkmar Jansson danke ich, dass ich an seiner Klinik die Experimente dieser Arbeit durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller danke ich für die Überlassung des praxisnahen und interessanten Themas und seiner Bereitschaft zur Diskussion, die für den Fortgang dieser Arbeit sehr wichtig war. Außerdem möchte ich ihm für das geschenkte Vertrauen herzlich danken.

Herrn PD Dr. med. Matthias Pietschmann danke ich für die stets gute Betreuung und die Zeit, die er sich für mich und diese Arbeit genommen hat.

Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr.-Ing Wolfgang Plitz, danke ich herzlich, da er mir durch seine große Erfahrung und seinen Rat stets eine Stütze war.

Ich möchte mich besonders bei Frau Dr. rer. nat. Birte Sievers bedanken, die durch ihre grenzenlose Geduld und ihre aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft für mich privat zum Vorbild wurde und besonders zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Durch ihre Erfahrung begleitete sie mich auch in schwierigeren Phasen dieser Arbeit und motivierte mich auch in problematischen Situationen neuen Mut zu fassen.

Ich bedanke mich bei Frau Bärbel Schmitt, die mich im Labor einarbeitete und mir bei vielen Experimenten helfend zur Seite stand und ohne deren Wissensschatz viele Experimente nicht so schnell gelungen wären. Ohne ihre Bereitschaft und Offenheit auch für private Gespräche hätte die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe nicht wachsen können.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Julia Redeker, die mich im Labor einarbeitete und deren Lebensfreude ansteckend war. Durch ihre besonnene Art war sie stets eine Stütze und wurde zu einer Freundin.

Außerdem danke ich Herrn Dipl.-Ing. Christian Schröder, den ich als Mensch sehr schätze und der mir durch seine Kompetenz in allen biomechanischen Fragestellungen uneigennützig weiterhalf.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Matthias Schieker und Frau Dr. rer. nat. Denitsa Docheva und ihrer Arbeitsgruppe, die mich bei vielen Auswertungen und Methoden molekularbiologischer Untersuchungen unterstützten.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester, die mir während der gesamten Zeit stets Mut zusprachen und auf deren Unterstützung und Rückhalt ich mich immer verlassen kann.

Ich bedanke mich bei allen Doktoranden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie, die alle für eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre sorgten und das Labor zu einem Ort machten an dem man gerne war. Einige wurden zu wahren Freunden.